

# **Etude du potentiel assainissant de plantes de services contre le flétrissement bactérien de la tomate (*R. solanacearum*) en conditions de plein champ**

**Félix MATHURIN**

**08-septembre 2011 – 07 mars 2012**



Maître de stage : Péninna DEBERDT

Tuteur campus : Brigitte BRUNEL

## **Remerciements**

Merci à Péninna DEBERDT et Paula FERNANDES pour m'avoir conseillé et encadré tout au long du stage.

Merci à Sonia MINATCHI et Régine CORANSON-BEAUDU pour m'avoir initié aux manipulations en laboratoires et pour leur aide précieuse.

Merci à Benjamin PERRIN pour m'avoir guidé durant les premières semaines du stage.

Merci à toutes les personnes qui ont participé à la mise en place de l'essai, notamment les techniciens du PRAM et les employés de Djiré.

Merci aux VSC, stagiaires et thésards qui ont rendu ce séjour en Martinique fort agréable.

# Sommaire

Introduction générale .....	5
PARTIE 1 : Etude bibliographique .....	6
A. A. L'agent <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	7
B. B. Les symptômes du flétrissement bactérien.....	7
C. C. Epidémiologie du flétrissement bactérien .....	7
1. Les statuts d'hôtes des plantes vis-à-vis de l'agent <i>R. solanacearum</i> .....	7
2. Les différents modes de propagation de <i>R. solanacearum</i> .....	7
3. Survie de l'agent <i>R. solanacearum</i> en conditions défavorables .....	8
4. Facteurs influençant la propagation de l'agent <i>R. solanacearum</i> .....	8
D. D. La situation de la tomate en Martinique.....	9
E. E. Les moyens de lutte contre le flétrissement bactérien .....	10
F. F. L'introduction de plantes de services dans les systèmes de cultures .....	11
PARTIE 2 : Matériels et méthodes .....	14
A. A. Matériel biologique.....	15
1. Le sol et la bactérie <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	15
2. Les plants de tomate .....	15
3. Les plantes de service .....	15
B. B. Méthodologie .....	16
1. Expérimentation en plein champ .....	16
2. Expérimentation en conditions contrôlées (serre) .....	23
3. Analyse du sol en laboratoire .....	25
4. Calculs et analyse des données .....	27
PARTIE 3 : Résultats et discussion .....	29
A. A. Potentiel infectieux du sol au temps initial .....	30
5. Evaluation au champ.....	30
6. Evaluation en serre .....	31
B. B. Production de biomasse par les plantes de services et teneur en azote minéral du sol .....	32
C. C. Evaluation du potentiel assainissant des plantes de services à cycle long .....	35
1. Modalité mulch seul .....	35
2. Modalité mulch + bâchage .....	37
D. D. L'état biologique du sol via l'analyse des activités enzymatiques – plantes de services cycle long .....	40
1. FDA .....	40

2.	$\beta$ -glucosidase .....	41
3.	Arylsulfatase .....	42
4.	Chitinase .....	43
E.	Evaluation du potentiel assainissant d'une plante de service à cycle court, <i>Raphanus sativus</i> .....	43
1.	Modalité mulch seul .....	44
2.	Modalité mulch + bâchage .....	45
F.	L'état biologique du sol via l'analyse des activités enzymatiques – plante de services cycle court .....	47
1.	FDA .....	48
2.	$\beta$ -glucosidase .....	48
3.	Arylsulfatase .....	49
4.	Chitinase .....	49
<b>PARTIE 4: Conclusions et perspectives .....</b>		<b>51</b>
<b>PARTIE 5: Bibliographie .....</b>		<b>53</b>
<b>PARTIE 6: Annexes.....</b>		<b>55</b>
A.	Annexe 1 : Plan de la parcelle, station expérimentale Rivière Lézarde .....	56
B.	Annexe 2 : Modalités de semis des plantes de services .....	57
C.	Annexe 3 : Engrais utilisés pour la croissance des plantes de service et de la tomate... Heatmaster en plein champ .....	58
D.	Annexe 4 : Protocoles d'activités enzymatiques simplifiés .....	59
E.	Annexe 5 : Protocole d'extraction in-situ de l'azote minéral du sol .....	61

## Introduction générale

L'agent du flétrissement bactérien, *Ralstonia solanacearum*, est une bactérie tellurique phytopathogène qui cause des dégâts considérables sur les cultures maraîchères à l'échelle mondiale. Il s'attaque à plus de cinquante familles de plantes dont la principale lui donne son nom : c'est la famille des solanacées, qui comprend de nombreuses espèces d'importances alimentaires et économiques majeurs. En Martinique, l'agent *R. solanacearum* provoque d'importantes pertes agricoles sur cultures maraîchères, en particulier sur les cultures de tomates.

Dans le contexte de la démarche d'intensification écologique engagée par le PRAM (Pôle de recherche agro-environnementale de la Martinique, regroupant CIRAD, IRSTEA et IRD), l'équipe de phytopathologie du CIRAD qui m'a accueillie participe à un projet de recherche visant à exploiter le potentiel des plantes de services dans les systèmes de culture pour la gestion du flétrissement bactérien de la tomate.

Mon stage s'est déroulé au sein de l'unité de recherche, HORTSYS, qui développe deux axes de recherches : (i) « l'Agroécologie, interactions et régulations biologiques dans les systèmes horticoles » (axe AIRB) et (ii) « Evaluation et conception de systèmes horticoles » (axe ECOS). Il s'inscrit dans l'axe AIRB et les projets DEVAG (INTERREG CARAIBES 2009-2012) et ATP OMEGA3 (2008-2011)

Le stage fait suite à différents travaux menés précédemment, sur la sélection de plantes de services sur des bases multicritères, et sur les modalités pour leur mise en place. Mes travaux font suite à ces études et marquent le passage de la serre vers les conditions de plein champ, afin de tester le potentiel assainissant de ces plantes sur le flétrissement bactérien de la tomate en plein champ, ainsi que sur l'activité des communautés microbiennes du sol.

## **PARTIE 1 : Etude bibliographique**

## **A. L'agent *Ralstonia solanacearum***

*Ralstonia solanacearum* est l'agent pathogène responsable du flétrissement bactérien. L'agent *R. solanacearum* est réparti à travers le monde et est considéré comme l'un des agents pathogènes les plus importants sur cultures maraichères de rente et vivrières. De nombreuses familles sont attaquées par cet agent pathogène, particulièrement les Solanacées.

## **B. Les symptômes du flétrissement bactérien**

La bactérie tellurique colonise les racines de la plante pour rejoindre le réseau systémique de celle-ci via les vaisseaux du xylème. Les bactéries se multiplient dans les vaisseaux et bloquent alors l'alimentation de la plante en eau et nutriments, ce qui a pour conséquence le flétrissement rapide et irréversible des jeunes feuilles, des feuilles adultes et enfin la mort de la plante. Les jeunes feuilles sont les premières à subir la chlorose et le flétrissement. Le ramollissement et le courbement vers la base des feuilles (épinastie foliaire) peuvent être suivis de l'apparition de petites protubérances de racines avortées à la base des tiges.

## **C. Epidémiologie du flétrissement bactérien**

### **1. Les statuts d'hôtes des plantes vis-à-vis de l'agent *R. solanacearum***

L'agent *Ralstonia solanacearum* possède deux types de plantes-hôtes:

- Les plantes hôtes sensibles dans laquelle la bactérie se développe normalement et entraîne le flétrissement irréversible et la mort de la plante. En Martinique, les plantes hôtes sont généralement partie des familles des solanacées, des cucurbitacées et des musacées.
- Les plantes hôtes latents ou « plantes réservoirs » qui hébergent la bactérie mais ne développent pas de symptômes visibles. Ce type d'hôte est problématique car la possibilité de propagation de la bactérie est accrue de part la présence de ces plantes porteuses saines (en générale des adventices) dans les parcelles.

### **2. Les différents modes de propagation de *R. solanacearum***

La propagation de la bactérie se fait par:

-**L'eau** : la maladie se répand facilement lors des épisodes pluvieux de la période d'hivernage (s'échelonnant de juin à février), mais aussi par les systèmes d'irrigation contaminés.

-**Les infestations primaires par les nématodes phytopathogènes** : la pénétration des bactéries est favorisée par les blessures présentes au niveau des racines, provoquées par notamment par les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* sp.

-**Le réseau racinaire des plantes contaminées** voisines aux plantes saines suffisamment proches.

-**Le même matériel agricole contaminé** utilisé dans un réseau de parcelles.

-**Le matériel végétal contaminé** (débris végétaux laissés en terre et adventices) : la bactérie peut en effet survivre dans un sol pendant 2-3 ans, sans mise en place d'une culture sensible en région tropicale, et au moins un an en Europe (Messiha *et al.* 2009). Elle peut se maintenir dans la rhizosphère des adventices hôtes, dans les débris végétaux, dans les plantes hôtes porteuses saines, à une profondeur de sol lui permettant une moindre concurrence avec les autres microorganismes.

### **3. Survie de l'agent *R. solanacearum* en conditions défavorables**

*Ralstonia solanacearum* peut survivre en conditions défavorables très différentes de son milieu de vie qu'est le sol cultivé. Ainsi, l'eau, le sol nu, les plantes hôtes saines ou plantes "réservoirs", les débris végétaux sont autant de milieux permettant à la bactérie de survivre et de se propager par la suite. Il est donc quasiment impossible d'éradiquer la bactérie, si ce n'est la contrôler, une fois qu'elle est implantée dans une zone géographique (Prior, 2003).

### **4. Facteurs influençant la propagation de l'agent *R. Solanacearum***

Certains facteurs influençant la propagation de la bactérie peuvent être liés aux pratiques culturales:

- une trop forte densité de semis
- un mauvais drainage impliquant la stagnation de l'eau
- la monoculture de Tomate en Martinique présente des inconvénients majeurs entraînant la fatigue des sols et ainsi la baisse de rendement et surtout une augmentation des maladies telluriques.
- aucune prophylaxie assurée (pas de désinfection des sols agricoles)

D'autres facteurs influencent la propagation de la bactérie :

#### **➤ Les différents types de sols**

La répartition mondiale de la bactérie démontre que cet agent pathogène peut s'adapter à divers types de sols. Cependant, les sols sableux sont moins propices à son installation contrairement aux



sols argileux et aux sols humides (Messiha *et al.*, 2009).

➤ **La population de nématodes du genre *Meloidogyne***

Le genre *Meloidogyne* sp est considéré comme le plus problématique et le plus répandu des nématodes ravageurs des cultures maraîchères. En Martinique, c'est le deuxième agent pathogène sur Tomate, après l'agent *R. solanacearum*. Les blessures occasionnées par les nématodes constituent des portes d'entrée pour *R. solanacearum*.

➤ **La répartition naturelle de la bactérie en climat tropical**

Même si la bactérie est présente en climat tempéré, notamment en Europe (race 3 dite race « froide », attaquant la pomme de terre), l'hiver ne lui permet pas de se propager. Le climat tropical caractérisé par une forte humidité et une forte chaleur avec des saisons peu marquées par des variations fortes de température est très propice à son développement. De plus ce type de climat permet la pratique des cultures en continu et n'incite pas les agriculteurs à la diversification des cultures.

## **D. La situation de la tomate en Martinique**

La culture de Tomate se fait essentiellement dans la région Nord Caraïbe de l'île, qui allie une humidité importante (2000 mm à 6000 mm de précipitation par an) et une bonne qualité des sols (texture argilo-limoneuse à argileuse). Le cycle de la tomate est de 5 mois et se pratique toute l'année en plein champ ainsi que sous serre. En règle générale, les plants sont préalablement produits en pépinière à partir de semences certifiées. Des études ont montré qu'un nombre de cycles successifs trop important sur le même sol entraînait une fatigue et une baisse de rendement de ces sols.. De plus, cette surproduction est associée à une augmentation des maladies telluriques.

Après les crises sanitaires de 2004 et de 2005, associées à de trop fortes précipitations (mai et novembre 2004), la production de tomates a chuté de 60% en 2004 pour atteindre 2000T, contre 6000T en 2003 (source DAF, 2006). La production a ré-augmenté progressivement, et ce malgré les aléas climatiques (passage du cyclone Dean). Aujourd'hui, le flétrissement bactérien ainsi que les bégomoviroses transmises par les aleurodes (*Bemisia tabaci*) engendrent un contexte très défavorable à la production de tomates, ce qui conduit à une augmentation excessive des prix.

Des entretiens téléphoniques réalisés lors d'une enquête auprès des agriculteurs par Charlotte MOISY (2012) ont révélé que beaucoup d'agriculteurs qui pratiquent la culture de tomate rencontrent des problèmes de flétrissement bactérien. Si certains envisagent de passer à la culture

sous abri, d'autres songent à abandonner la culture de tomate, jugée actuellement trop risquée (communication personnelle).

## E. Les moyens de lutte contre le flétrissement bactérien

Différentes stratégies permettent de lutter contre l'agent *Ralstonia solanacearum*, parmi lesquelles :

- **L'emploi de variétés tolérantes/résistantes** (cas de la variété modérément résistante « Heatmaster », largement commercialisée en Martinique) reste la méthode la plus prometteuse. Cependant le développement de variétés résistantes se heurte à deux défis majeurs : (i) la forte variabilité génotypique et phénotypique de la bactérie, ainsi que sa forte plasticité génomique, et (ii) le caractère souvent quantitatif de la résistance de l'hôte, associé à de fortes interactions avec les conditions environnementales. D'autre part, l'émergence d'une nouvelle population plus agressive et présentant un plus large spectre d'hôtes en comparaison à la population historiques a été reportée en 2007 dans la littérature par Wicker *et al.* (2007). Cette population émergente de *R. solanacearum* est capable de contourner la résistance de la variété « Heatmaster », ce qui montre les limites de cette méthode de lutte.
- **Les méthodes prophylactiques permettent de prévenir le développement de la maladie (transmission et dissémination)** *via* différentes méthodes culturales telles que l'utilisation de matériel sain (outils, semences), le contrôle de la densité de la plantation, la gestion du drainage des parcelles, ainsi que l'arrachage des plants infestés.
- **L'apport d'amendements organiques.** L'incorporation de composts dans du sol contaminé aurait permis de limiter l'incidence du flétrissement bactérien en stimulant l'activité microbienne de ces sols (Islam *et al.*, 2003). L'apport d'amendement conventionnel semblerait réduire la population de *Ralstonia solanacearum* dans un sol infesté, notamment à cause des variations de pH et d'un effet nocif du nitrite sur l'agent bactérien (Michel *et al.*, 1998).
- **La mise en place de rotations/associations culturales.** Des rotations culturales de durées de 2 à 5 ans faisant intervenir des espèces végétales non-hôtes semblent diminuer de manière significative l'incidence du flétrissement bactérien sur les solanacées (Adebayo *et al.*, 2009 ; Michel *et al.*, 1996 ; Autrique *et al.*, 1987).

Dans les conditions pédo-climatiques de la Martinique d'une part, et compte tenu des traits de

vie de la bactérie d'autre part (large spectre de plante hôte, capacité à survivre plusieurs années dans le sol sans culture sensible), la voie qui semble la plus pertinente pour réduire l'incidence de cette maladie de façon durable sur les cultures d'intérêt économique est l'introduction dans les systèmes de culture de plantes dotées de propriétés assainissantes. Les effets attendus peuvent, en sus des effets biocides directs de la plante sélectionnée sur l'agent pathogène-cible, combiner les avantages des rotations culturales, de la gestion des résidus et de l'apport de matière organique.

## **F. L'introduction de plantes de services dans les systèmes de culture**

Dans un souci de réduire les intrants de synthèse utilisés dans les systèmes de culture, l'accent est mis depuis quelques années sur l'utilisation de plantes dites de services.

Cultivées en association, comme plantes de couvertures ou encore intégrées dans des rotations culturales, elles peuvent avoir divers effets bénéfiques sur les systèmes de culture suivant leurs caractéristiques. Elles peuvent permettre (i) le contrôle des adventices, (ii) la protection contre l'érosion, (iii) l'augmentation de la fertilité du sol, (iv) la modification des propriétés physiques du sol *via* leur système racinaire, et aussi (v) gérer les maladies. Ce dernier aspect, intéressant pour la lutte contre *Ralstonia solanacearum*, reste un sujet encore méconnu, et on ne dispose actuellement que de rares articles sur ce sujet au sein de la littérature scientifique (Cardoso *et al.*, 2006 ; Terblanche and De Villiers, 2001 ; Yu, 1999).

L'utilisation de ces plantes de services pour la lutte contre les bioagresseurs peut mettre en jeu différents mécanismes. Les mécanismes peuvent être :

- Par voie « directe » sur les bioagresseurs : production de substances toxiques par la plante, allélopathie, rupture du cycle infectieux, modification du microclimat, barrière naturelle, concentration de ressources.
- Par voie « indirecte » : développement de « prédateurs naturels » des bioagresseurs, effet « piège », amélioration du sol (régime hydrique modifié, porosité, minéralisation, apport organique et azoté...) susceptible de fournir une résistance accrue à la culture principale, mais également modification de la microflore et effets compétiteurs antagonistes sur les populations de bioagresseurs.

### ➤ **Modification des populations microbiennes**

Parmi les moyens de lutte contre *Ralstonia solanacearum*, le concept de « contrôle biologique » a fait son apparition. Elle réside dans les interactions entre micro-organismes, et plus précisément sur l'effet antagoniste que pourraient avoir certains microorganismes du sol sur l'agent *Ralstonia solanacearum*.

L'épandage de différentes souches de bactéries lors d'une culture de tomates sur sol infesté a permis de montrer une diminution de l'incidence de la maladie, ainsi que des rendements plus élevés (Guo et al, 2003). Une liste de bactéries du sol jugées antagonistes à *R. solanacearum* a été établie par Smith & Saddler (2001). Mais le contrôle du flétrissement bactérien *via* l'application directe de ces microorganismes antagonistes n'est pas efficace et durable en plein champ, du fait de la difficulté des « agents de biocontrol » à s'adapter et persister en conditions naturelles.

Cependant, l'utilisation d'une plante de service telle que *Mucuna deeringiana* pour le contrôle des nématodes montre que la plante induit des changements significatifs sur les populations microbiennes du sol *via* sa rhizosphère, et ce sur un long terme (Vargas-Ayala *et al.*, 2000). L'utilisation de plantes de services aux effets similaires pourrait permettre de favoriser le développement de populations microbiennes antagonistes à *R. solanacearum*, agent du flétrissement bactérien et ce, de manière efficace et durable.

La modification de la microflore du sol *via* le développement de communautés antagonistes aux bioagresseurs peut également être induite par la décomposition de matériel végétal (matière organique exogène) incorporé au sol (Cardoso *et al.*, 2006).

### ➤ **Le concept de biofumigation**

L'utilisation de substances fumigantes lesquelles émettent et diffusent des composés volatiles biocides à large spectre, a longtemps été un moyen de lutter contre les agents pathogènes telluriques (en particulier contre les nématodes phytoparasites). Ces fumigants peuvent être synthétisés chimiquement (comme le bromure de méthyle) mais sont nocifs pour l'environnement. Néanmoins, des biofumigants naturels existent et sont tout aussi efficaces.

Le concept de biofumigation *via* l'utilisation de plantes de services est un processus de biodégradation qui consiste à broyer et à enfouir une plante dans un sol, à un stade donné de la culture. Auparavant, ce processus n'incluait que les Brassicacées, famille regroupant néanmoins 350 genres et 2500 espèces. Ces dernières, une fois broyées, relâchent des composés toxiques volatiles, les isothiocyanates, issus de l'hydrolyse des glucosinolates par une enzyme, la myrosinase. Désormais le panel des espèces végétales biofumigantes contenant des glucosinolates s'est élargi (*Capparaceae*, *Moringinaceae*) (Matthiessen & Kirkegaard, 2006).

La biogumigation permet de lutter contre une grande diversité de phytopathogènes (insectes, bactéries, champignons, nématodes) mais aussi contre les mauvaises herbes. Une fois que la plante est broyée finement et enfouie dans le sol, l'émission des composés toxiques se fait rapidement et leur diffusion est d'autant plus favorisée que le sol est bien irrigué (effet à court terme). De plus, l'apport de matières organiques enfouies favoriserait à long terme l'activité microbienne du sol et de ce fait les compétitions entre micro-organismes pathogènes et antagonistes (prédateurs, parasites) (Matthiessen & Kirkegaard, 2006).

Concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum*, une gamme de plusieurs espèces de Brassicacées a été testée pour leur capacité à réduire l'incidence de la maladie sur la tomate (Arthy *et al.*, 2002). L'efficacité diffère selon les espèces, notamment en fonction de la teneur en glucosinolates des espèces, et des types d'isothiocyanates présents dans les plantes.

### ➤ Allélopathie

L'allélopathie est l'ensemble de plusieurs interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives, entre plantes mais aussi entre une plante et un microorganisme, au moyen de métabolites secondaires tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les alcaloïdes.

Yu (1999) a montré l'effet suppressif d'une culture de cive chinoise (*Allium tuberosum*) en association avec des tomates sur l'agent *R. solanacearum*. L'incidence de la maladie sur les tomates était significativement plus faible comparée au témoin sol nu. De plus il a montré que la population de *R. solanacearum* diminuait dans un sol sur lequel poussaient des cives chinoises par rapport au témoin sol nu. L'effet suppressif des exsudats racinaires a été confirmé *in-vitro* (Yu, 1999).

L'effet suppressif d'exsudats racinaires de certaines plantes sur *R. solanacearum*, s'il semble démontré en conditions contrôlées et *in vitro*, resterait à confirmer en conditions de plein champ.

## **PARTIE 2 : Matériels & Méthodes**

## A. Matériel biologique

### 1. Le sol et la bactérie *Ralstonia solanacearum*

L'essai au champ a été réalisé sur une parcelle du site expérimental de Rivière-Lézarde où la présence des souches appartenant aux deux populations (historique et émergente) a été confirmée dans le cadre d'une étude réalisée au laboratoire de phytopathologie du PRAM. Une culture de tomates a été réalisée sur la parcelle avant le lancement de l'essai afin de multiplier et homogénéiser l'inoculum naturel de la parcelle en *R. solanacearum*.

### 2. Les plants de tomate

La tomate est l'indicateur biologique de l'évaluation de l'impact des Plantes de services sur le potentiel infectieux du sol en *R. solanacearum*.

Pour l'essai au champ les plants de tomate de la variété Heatmaster ont été transplantés au stade 12-15 jours après avoir été semés au préalable en pépinière (pépinière Adèle, Saint Joseph), sur terreau en mottes non infesté.

Pour l'essai en serre, des plants de la variété Roma ont également été utilisés.

### 3. Les plantes de service

Au sein des projets DEVAG (INTERREG CARAIBES, 2009 – 2012), ATP OMEGA 3 (CIRAD, 2009 – 2011), six plantes de services ont été sélectionnées sur une base multicritères à partir de deux évaluations :

- Une évaluation du comportement d'espèces végétales vis-à-vis de *R. solanacearum* et de *M. incognita* en conditions contrôlées.
- Une évaluation agronomique de plein champ.

Des essais menés au sein de ces projets ont permis d'expérimenter différentes modalités dans la mise en place des traitements.

Les résultats obtenus en conditions contrôlées ont révélé :

- Un effet suppressif de *Crotalaria juncea*, *Crotalaria spectabilis* et *Allium fistulosum*, au cours de la phase culturale.
- Un effet suppressif de *C. juncea* au cours de la phase d'amendement au sol (incorporation des plants au sol).

- Les PdS à « cycle court » n'ont pas révélé de réduction significative de la maladie ni avec *Raphanus sativus*, ni avec *Tagetes patula* par rapport au sol nu, et ce quelle que soit la phase testée. Cependant, si *Tagetes patula* a montré une augmentation des symptômes comparé au témoin tomate, *R. sativus* réduisait de façon significative la maladie par rapport au témoin tomate, après amendement du sol.

Pour le passage en plein champ, les itinéraires ont été optimisés : seules les parties aériennes des PdS ont été coupées et déposées à la surface du sol en « mulch », sans incorporation mécanique dans le sol. Les parties souterraines (systèmes racinaires des PdS) n'ont pas été prélevées, ceci afin de ne pas créer de perturbation physique du sol.

*Tagetes patula* n'a pas été retenu pour le passage au champ, et *Vigna unguiculata* a été intégré à l'essai, du fait de ses atouts connus pour les agriculteurs au niveau économique (production de biomasse importante, engrais vert, plante fourragère).

Pour l'essai au champ, les plantes testées sont :

1 plante à cycle court (35 jours) :

- ♣ 1 Brassicacée : *Raphanus sativus* cv. Melody

5 plantes à cycle long (70 jours) :

- ♣ 4 Fabacées : *Mucuna deeringiana* “Singapour”, *Crotalaria juncea* cv.IAC-1, *Crotalaria spectabilis* et *Vigna unguiculata* cv. Ebony
- ♣ 1 Alliacee: *Allium fistulosum* cv. Oignon blanc

L'oignon pays (*Allium fistulosum*) a été acheté en coopérative (SODIFEL, Martinique) et a été transplanté après démariage des bulbes.

Les cinq autres plantes de services ont été semées directement au champ.

## **B. Méthodologie**

### **1. Expérimentation en plein champ**

#### ***Dispositif expérimental***

Le dispositif expérimental est un dispositif « factoriel en blocs », avec 3 blocs (**Annexe 1**) :



Chaque bloc est composé de 12 traitements « plantes de service » et de 6 traitements « témoins », avec ou sans bâchage (**Tableau 1**), affectés au hasard dans chaque bloc. Les traitements prennent place sur des placettes de dimension 2.40m\*3.20m soit 7.68 m². La position des placettes a été tirée au hasard au sein de chaque bloc.

Cycle	Espèce/ Plante de service PdS	MULCH seul	MULCH + BACHAGE
Cycle long (70 jours) - CL	<i>Mucuna deeringiana</i>	T1	T2
	<i>Crotalaria juncea</i>	T3	T4
	<i>Crotalaria spectabilis</i>	T5	T6
	<i>Allium fistulosum</i>	T7	T8
	<i>Vigna unguiculata</i>	T9	T10
	Sol nu 70 J	T11	T12
Commun CL-CC	Tomate	T13	T14
Cycle court (35 jours) - CC	<i>Raphanus sativus</i>	T15	T16
	Sol nu 35 J	T17	T18

**Tableau 1:** Liste des plantes de services à tester et codes des différents traitements

### Les témoins

**La tomate**, *Lycopersicon esculentum* cv. Heatmaster, constitue le témoin sensible à l'agent bactérien en conditions au champ. La variété Heatmaster a été choisie comme variété commerciale agricole de référence, sensible aux souches appartenant à la population émergente de *Ralstonia solanacearum*. Ce témoin permet d'évaluer le potentiel infectieux du sol soumis à la culture d'intérêt commercial.

**Le sol nu** constitue le témoin sans plante. Ce sol est désherbé régulièrement afin de ne pas avoir de couvert végétal avec une flore adventice susceptible d'héberger l'agent *R. solanacearum*. Ce témoin permet d'évaluer la survie de l'inoculum dans un sol sans plante.

## ***Déroulement de l'essai***

### **Phase 1 :**

Les plantes de service à cycle long sont plantées au champ en même temps et cultivées pendant une durée de 70 jours (10 semaines).

A cause des adventices et du fait qu'elle correspond normalement à une culture de rente pour les agriculteurs, les placettes d'*A. fistulosum* (oignon péyi) ont été désherbées 35 jours après leur plantation.

La plante de services à cycle court (*Raphanus sativus* cv. Melody) est semée 35 jours après la date du semis des plantes à cycle long et est donc cultivée pendant une durée de 35 jours (5 semaines).

Deux cycles de culture de tomate variété Heatmaster sont effectués durant la phase de croissance des plantes de services et constituent le témoin tomate. Chaque cycle de culture dure 35 jours. Le premier cycle servira de témoin lors des analyses des activités enzymatiques pour les plantes de cycle de long, tandis que le second servira de témoin pour ces mêmes analyses pour la plante de cycle court. Après transplantation des tomates en plein champ, on effectue du recourage pendant une semaine afin de remplacer les plants morts suite au stress de la transplantation ou d'une autre cause que l'agent bactérien (oiseaux, noctuelle, attaque de courtilières, pourriture du collet), et ainsi optimiser le suivi de la maladie.

Les témoins sol nu sont désherbés une fois par semaine durant toute la phase de croissance des plantes de service.

Les modalités de semis et les engrais apportés sont disponibles en **Annexes 2 & 3**.

### **Phase 2 :**

À la fin de la phase de culture, les plantes de service sont coupées à la base des tiges et les parties aériennes sont déposées en surface sous forme de « mulch », sans enfouissement. Les parties racinaires sont maintenues dans le sol.

Les plants de tomates restant sur les placettes « témoin tomates » sont arrachés et éliminés. C'est à cette étape qu'est mis en place le paillage plastique (**Figure 1**). La durée de ce « mulch », avec ou sans paillage plastique est de 35 jours (5 semaines).



**Figure 1** : Mise en place du paillage plastique.

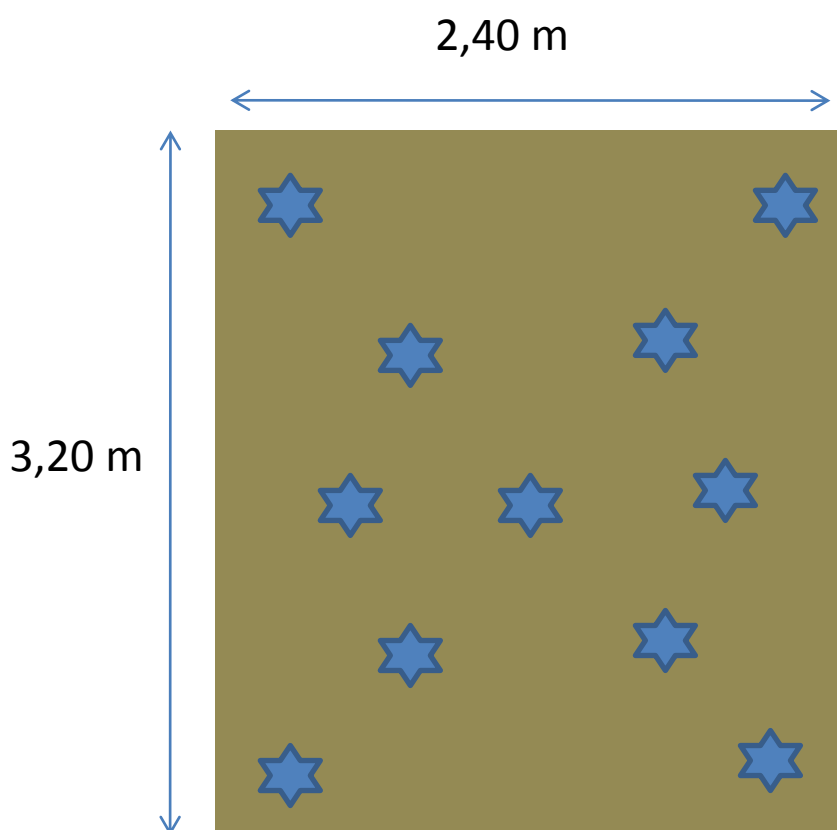
### Phase 3 :

Après la phase de mulch, des plants de tomates de la variété Heatmaster âgés de 10-15 jours sont transplantés au champ en direct, sans travail du sol. Un suivi épidémiologique est réalisé pendant 37 jours (5 semaines) et permet d'évaluer le potentiel assainissant des traitements plantes de services. Un suivi du développement végétatif est également réalisé (hauteur des plants, chlorophylle-meter, nombre de bouquets), ainsi qu'une mesure du rendement.

### ***Prélèvements de sol***

En début de chaque phase, des prélèvements de sol sont effectués sur chaque placette à l'aide de tarières pédologiques, sur une profondeur de 10 cm à 15 cm de sol (correspondant à la zone de prospection des racines de tomate). Les prélèvements ont été effectués en croix sur chaque placette, pour obtenir environ 5kg de sol afin d'effectuer les différentes analyses en laboratoire et l'essai en conditions contrôlées de serre (**Figure 2**).

Aux débuts des phase 1 (D1) et Phase 2 (D2), la modalité « bâchage » n'ayant pas encore été mise en place, les échantillons de sol ont été « poolés » par traitement « Espèce/plante de service » (avec et sans bâchage). Les échantillons composites ont été T1/T2, T3/T4, T5/T6, T7/T8, T9/T10, T11/T12, T13/T14, T15/T16, et T17/T18 ; (Cf. **Tableau 1**).



**Figure 2** : Mode d'échantillonnage du sol sur les placettes en plein champ. Les étoiles bleues représentent les points de prélèvement à la tarière (prélèvement en croix).

### ***Mesures de production de biomasse par les plantes de services***

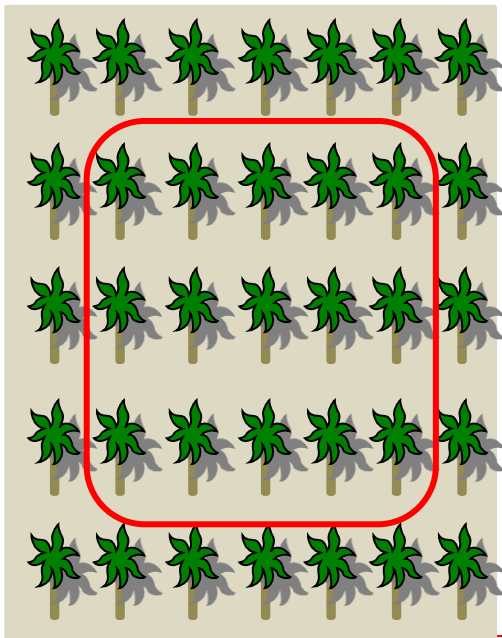
A la fin de la phase (date D1) la totalité des parties aériennes de chaque placette plantes de services est pesée afin d'obtenir la production de biomasse fraîche (**Figure 3**). Elles sont ensuite redéposées sur les placettes pour constituer le « mulch » amendé au sol. Au moment de la pesée, les parties aériennes de 5 plantes sont prélevées au hasard pour être séchées à l'étuve à 65°C pendant 48h afin de déterminer le taux de matière sèche. Le taux de matière sèche permet de calculer la production de biomasse sèche sur les placettes (en kg/ha).



**Figure 3** : Au premier plan les sacs dans lesquels sont placées les parties aériennes des plantes de services afin d'être pesées. Au second plan les placettes sur lesquelles ont été déposées les parties aériennes (biomasse fraîche) pour le « mulch », avec ou sans paillage plastique.

### *Suivi de l'épidémiologie du flétrissement bactérien en plein champ*

Sur chaque placette, 35 plants de tomate « Heatmaster » sont plantés en 7 X 5. Le suivi du flétrissement bactérien est réalisé uniquement sur 15 plants (



**Figure 4).**

**Figure 4** : Plants de tomates suivis pour le suivi du flétrissement bactérien (cadre rouge).



### **Suivi sur les témoins tomates en phase 1**

L'enregistrement du nombre de plants de tomate flétris est réalisé 2 fois par semaine, durant 35 jours, pour les deux cycles des témoins tomates de la Phase 1 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).



**Figure 5** : Plant de tomate atteint de flétrissement bactérien (au centre) entouré de deux plants de tomate sans symptôme, sur une placette de l'essai (station expérimentale de Rivière-Lézarde).

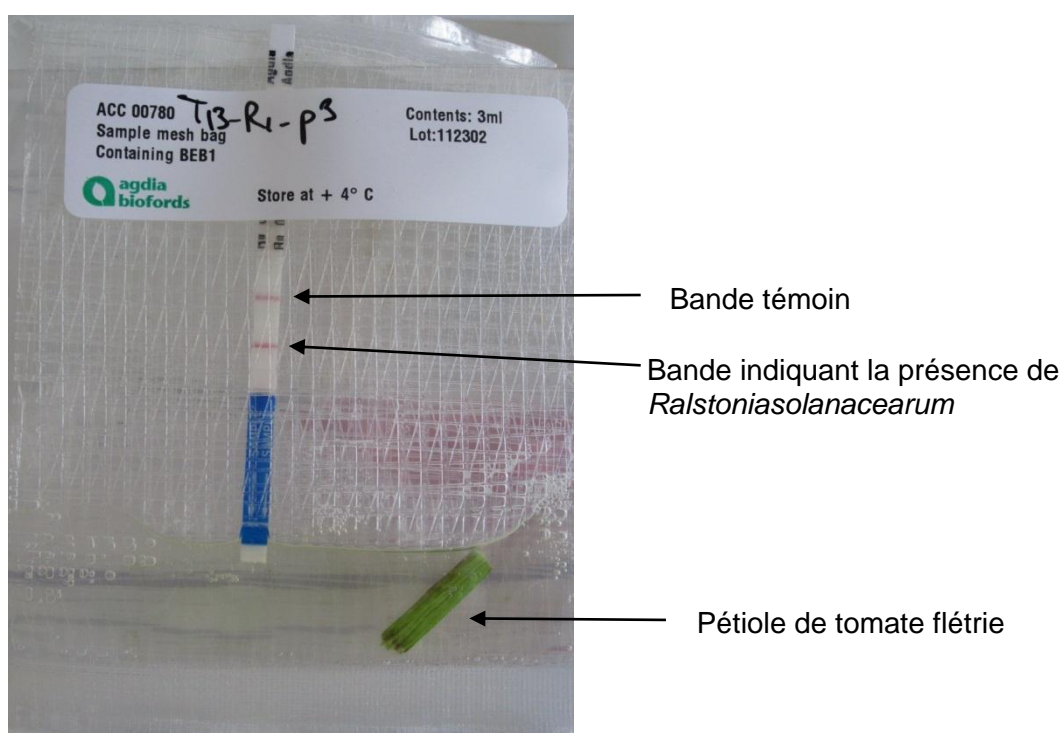
### **Suivi sur les bio-indicateurs tomates en phase 3**

L'enregistrement du nombre de plants de tomates flétris est réalisé 2 fois par semaine, durant 37 jours. A ce stade les tomates ont effectué leur floraison et commencent à fructifier. L'infection par l'agent *R. solanacearum* est confirmée par un test diagnostic par flashkitRs (kit de terrain ImmunoStrip® (AGDIA Biofords) qui a été effectué sur les 5 premiers plants flétris par placette (

**Figure 6**). Ce kit permet de ne pas arracher les tomates entières pour analyse (test non destructif) et ainsi de ne pas perturber la dynamique d'évolution des populations de *R. solanacearum* dans le sol.

Le suivi du développement du flétrissement bactérien est réalisé :

- (i) durant la Phase 1, sur les traitements témoins tomate où 2 cycles de culture de 35 jours ont été réalisés successivement
- (ii) durant la Phase 3 afin de mesurer l'incidence du flétrissement bactérien sur les placettes soumises aux différents traitements



**Figure 6** : Diagnostic à l'aide du flashkitRs

## 2. Expérimentation en conditions contrôlées (serre)

Afin d'estimer le potentiel infectieux du sol à différentes étapes de l'expérimentation de plein champ, des plants de tomate ont été transplantés dans du sol prélevé des différentes placettes de l'expérimentation au champ, à des dates déterminées (correspondant au début de chaque Phase 1,2 et 3). Le développement du flétrissement bactérien sur les bioindicateurs tomate a été suivi en conditions contrôlées, en serre de phytopathologie, sur le site du PRAM (Petit Morne, Martinique).

## ***Dispositif expérimental***

Le sol prélevé sur la parcelle de Rivière Lézarde est transféré dans des pots de 7x7x7cm après homogénéisation.

Un dispositif en 3 blocs a été mis en place, avec pour chaque bloc 12 pots par traitement (1 plant de tomate/pot), soit un total de 36 pots par traitement. La position de chaque lot de 12 pots a été tirée au hasard au sein de chaque bloc (**Figure 7**).



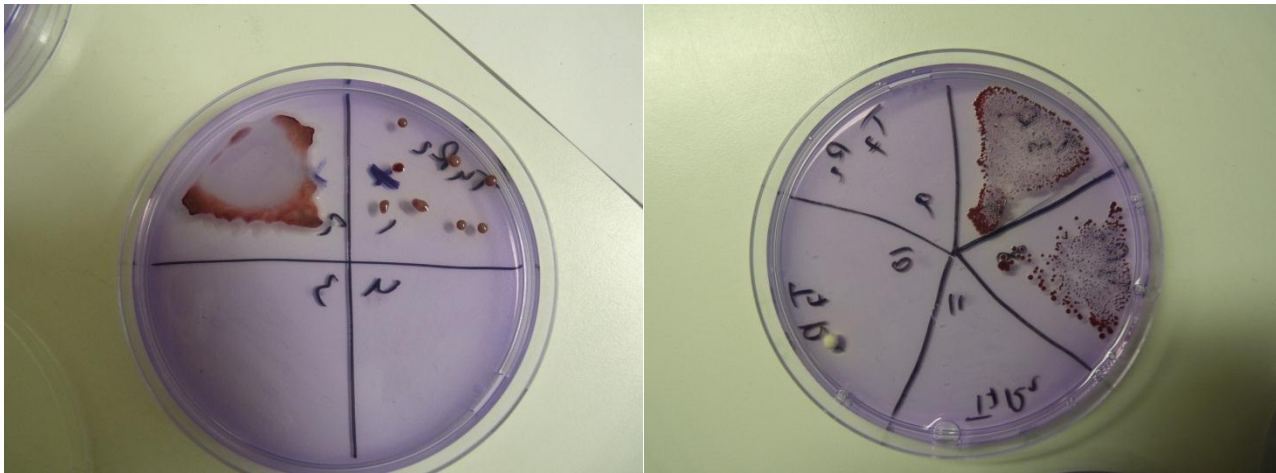
**Figure 7** : Dispositif expérimental en serre

## **Suivi de l'épidémiologie du flétrissement bactérien en serre**

Le nombre de plants de tomates flétris a été enregistré 3 fois par semaine pendant une durée de 28 jours (4 semaines). L'infection par l'agent *R. solanacearum* a été confirmée par la méthode d'isolement microbiologique classique sur les 5 premiers plants flétris, sur milieu semi-sélectif SMSA.

A la fin de l'expérimentation, les plants qui n'ont pas développé de symptômes ont été testés pour la présence de *R. solanacearum* à l'état latent à la base de tige, par la méthode d'isolement sur milieu SMSA (**Figure 8**).





**Figure 8** : Observation des colonies de *R. solanacearum* sur milieu semi-sélectif SMSA. La boîte de gauche comporte des colonies de *R. solanacearum* dans sa partie supérieure, reconnaissables par leur aspect muqueux. La boîte de droite contient des colonies de bactéries autres que *R. solanacearum*, différenciables du fait de leur aspect beaucoup plus « sec ».

### 3. Analyse du sol en laboratoire

#### ➤ *La méthode enzymologique : FDA, Bétaglucosidase, Arylsulfatase et Chitinase*

De plus en plus, un effort est réalisé sur la possibilité d'utiliser certains paramètres du sol afin d'en déterminer sa qualité (Jordan *et al.*, 1995 ; Trasar-Cepeda *et al.*, 1998).

La qualité du sol a été définie comme la capacité d'un sol à évoluer au sein d'un écosystème afin de maximiser la production biologique et minimiser la dégradation sur l'environnement (Doran and Parkin, 1994 ; Gregorich *et al.*, 1994). Au sein des paramètres biochimiques et biologiques pouvant servir d'indicateurs de cette qualité, l'activité enzymatique représente un bon indicateur de l'activité de communautés microbiennes spécifiques (Frankenberger and Dick, 1983 ; Nannipieri *et al.*, 1990). La biomasse microbienne étant considérée comme la première et principale source d'enzymes dans le sol, on peut associer une variation d'activité enzymatique avec celle des microorganismes responsables de cette activité. Certaines enzymes sont associées à une communauté microbienne spécifique, tandis que d'autres sont un bon indicateur de l'activité microbienne totale du sol.

#### **Arylsulfatase**

Les sulfatases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse d'ester sulfate, une forme de soufre (S) présent en grande concentration dans la surface des sols. L'arylsulfatase serait responsable du cycle du soufre dans le sol car intervient dans les processus de minéralisation du soufre et de sa mise à disposition à la plante. Cette enzyme représenterait également un sous-groupe de champignons

antagonistes des pathogènes telluriques et pourrait de fait être un indicateur de suppressivité.

### **FDA (Hydrolyse de la fluorescéine diacétate)**

L'activité microbienne totale est une bonne mesure du turnover de la matière organique, 90% du flux d'énergie transitant à travers les microorganismes décomposeurs (Heal *et al.*, 1975).

La FDA est hydrolysée par un grand nombre d'enzymes : protéases, lipases, estérases. Le produit obtenu est la fluorescéine. Etant le substrat de nombreuses réactions du métabolisme du sol, la FDA représente un bon indicateur de l'activité microbienne totale dans le sol et de son fonctionnement biologique.

### **$\beta$ -glucosidase**

Le groupe des  *$\beta$ -glucosidases* est l'un des groupes d'enzymes les plus répandus dans le sol. Ces enzymes permettent d'hydrolyser les  $\beta$ -glucosides généralement fournis au sol via les résidus de plantes. Les produits de cette hydrolyse sont utilisés par les microorganismes du sol. (Hayano K, 1973)

Parce qu'elle intervient dans les cycles du carbone et de l'azote, cette enzyme peut refléter le statut de la matière organique et les processus s'y opérant (Tejada *et al.*, 2009).

### **Chitinase**

La chitine est un polymère de N-acétyl-glucosamine. C'est un des constituants principaux des membranes cellulaires et tissus des insectes, crustacés et de nombreuses espèces de champignons. L'hydrolyse enzymatique de la chitine en acétylglucosamine est réalisée par deux hydrolases : la chitinase et la chitobiase. Les chitinases sont courantes dans la nature et sont produites à la fois par des bactéries, des champignons et les glandes digestives d'animaux qui consomment de la chitine. Cependant, les études montrent que la dégradation et formation de chitine dans le sol sont dues principalement aux actinomycètes (Mitchell and Alexander, 1962). L'activité de cette enzyme correspond à l'une des principales sources d'azote minéralisable. Une haute activité de la chitinase peut être associée à une résistance aux nématodes à galles (Chernin and Chet, 2002).

Pour ces quatre enzymes, le schéma de protocole est globalement le même et suit les étapes suivantes :

- Pesée des échantillons : pour chaque numéro de traitement, trois échantillons sont prélevés, et un témoin ajouté. On pèse 1g de terre fraîche par tube Falcon, sauf pour la FDA (0,5g). Les pesées peuvent se faire la veille de l'analyse. Un blanc par série est également réalisé.

- Ajout d'un substrat et mise à incubation. Les échantillons sont mélangés via un agitateur après ajout du substrat, et placés dans l'incubateur à 37°C pendant une durée spécifiée (1h pour arylsulfatase et  $\beta$ -glucosidase, 3h pour FDA, 4h pour chitinase).
- Après incubation, la réaction est arrêtée, et l'on mesure (après filtration et centrifugation éventuelles) l'absorbance dans des micro-cuves de spectrophotométrie. Il faut avoir au préalable réalisé les mesures d'absorbance de la gamme étalon du jour. Les résultats sont exportés en fichier .csv.

Les protocoles simplifiés pour chaque analyse enzymatique sont en **Annexe 4**.

#### ➤ **Teneur en $NH_4$ et $NO_3$**

Après avoir réalisé l'extraction au KCl 1M, les échantillons sont envoyés pour dosage au laboratoire de pédologie du PRAM via un analyseur automatique. On récupère ensuite les données de teneur en  $NH_4$  et  $NO_3$  pour chacun des échantillons (Cf. **Annexe 5**).

#### ➤ **La méthode FAME (Fatty Acid Methylated Esters)**

Cette analyse permet d'obtenir une vision globale des principaux groupes fonctionnels et leur réponse. Le but est de déterminer quels groupes présentent un fort niveau de suppressivité des parasites telluriques (*R. solanacearum* ou nématodes à galles).

Cette méthode quantitative fournit une bonne estimation de la taille et des différences relatives entre les différents groupes fonctionnels (notamment bactéries Gram+ et Gram-, biomasse fongique, actinomycètes, protozoaires) selon le mode de gestion des sols, notamment pour mettre en évidence les effets de plantes assainissantes. Elle permet également d'identifier des indicateurs de suppressivité des sols (ratios fongiques/bactériens) qui sont quantitatifs et reproductibles, facteur qui pourrait par la suite faciliter leur transfert.

## **4. Calculs et Analyse des données**

Le suivi du développement du flétrissement bactérien, aussi bien en plein champ qu'en serre, a permis de calculer :

### • **L'indice de flétrissement bactérien (IFB)**

L'indice de maladie correspondant au nombre de plants flétris comparé au nombre de plants total.

Le nombre de plants flétris à la date tk nous permet d'évaluer l'incidence de la maladie à ces mêmes dates et son évolution au cours du temps représenté par la courbe  $IFB=f(t)$  avec pour chaque date (tk) :

$$IFB(tk) = \text{nb de plants flétris à la date tk} / \text{nb total de plants}$$

Il a été ensuite transformé en pourcentage de plants flétris.

- **L'aire sous la courbe caractérisant la sévérité de la maladie (AUDPC)**

L'AUDPC mesure la sévérité de la maladie. C'est la quantité de la maladie présente sur la plante.

Les données des indices de flétrissement à différentes dates nous permettent d'évaluer la sévérité de la maladie et son évolution au cours du temps représentée par la courbe  $AUDPC=f(t)$  avec pour chaque date  $t$  :

$$AUDP(tk) = \sum (IFB_i + IFB_{i+1}) (t_{i+1} - t_i) / 2$$

- **L'indice de colonisation (IC)**

L'indice de colonisation correspond au nombre total de plants colonisés par *R. solanacearum* sur le nombre total de plants. Le nombre de plants colonisés est la somme du nombre de plants flétris obtenu à la fin de l'expérimentation et du nombre total de plants sans symptômes avec infections latentes (i.e. le nombre de plants encore vivants à la fin de l'expérience mais hébergeant la bactérie à la base de tige).

- **Traitement statistiques des données**

Afin de réaliser les analyses statistiques, l'indice de flétrissement bactérien (IFB) a été transformé en  $\text{Asin}(\text{rac}(\text{IFB}))$ . Pour l'essai en serre la même transformation a été effectuée sur l'indice de colonisation (IC) :  $\text{asin}(\text{rac}(\text{IC}))$ . L'AUDPC a été transformée en  $\text{rac}(\text{AUDPC})$ .

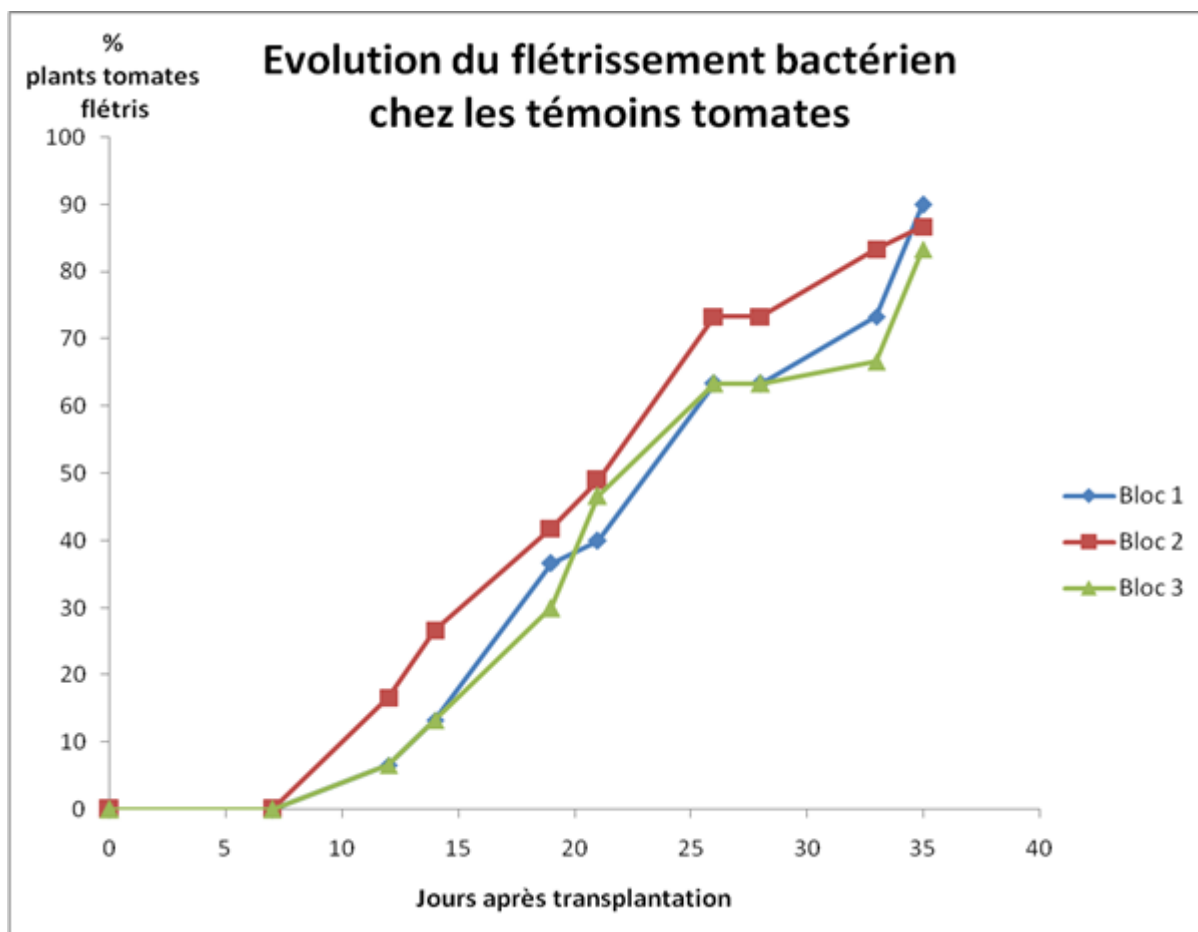
Une ANOVA classique et un test de comparaison des moyennes (Test Fischer LSD) ont été réalisés sur les données IFB et AUDPC avec le logiciel XLSTAT (Version 2011.5.01). Les effets « traitements », « blocs » et l'interaction « blocs x traitements » ont été étudiés.

## **PARTIE 3 : Résultats & discussion**

## A. Potentiel infectieux du sol au temps initial

### 1. Evaluation au champ

Le suivi de l'évolution de la maladie sur les placettes « témoins tomate » en plein champ durant la phase de croissance des plantes de service (Phase 1), a permis d'évaluer le potentiel infectieux du sol de la parcelle au temps initial (**Figure 9**).



**Figure 9** : Evolution du flétrissement bactérien sur l'ensemble des placettes « témoin tomates » dans les différents blocs durant la phase de croissance des plantes de services.

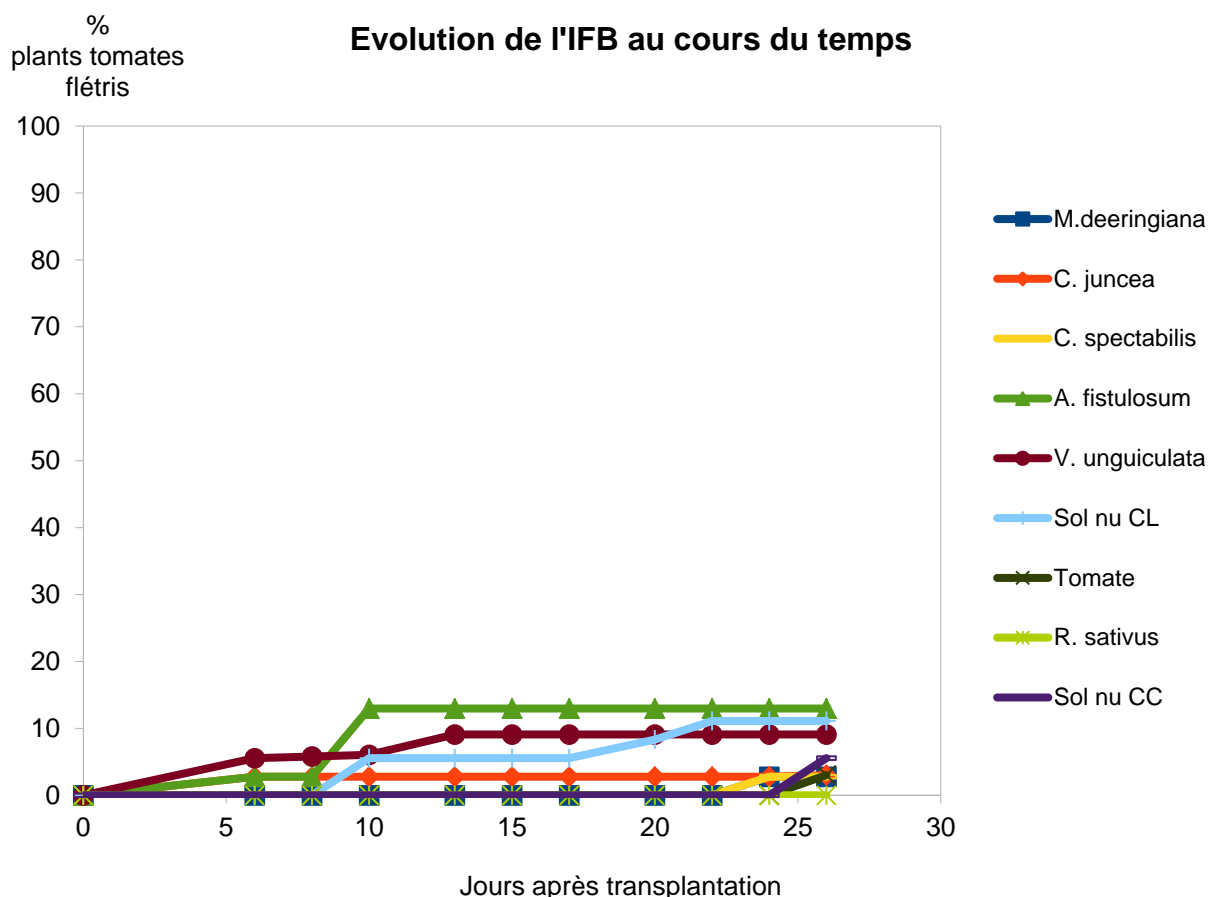
Les premiers plants flétris apparaissent entre le 5<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jour après transplantation des tomates et la maladie évolue rapidement pour atteindre une moyenne de 87% de plants flétris sur l'ensemble des blocs, 35 jours après transplantation. Les analyses statistiques n'ont pas révélé d'effet bloc et l'incidence de la maladie est significativement identique sur toutes les placettes « témoin tomates », 35 jours après transplantation.

Ces résultats nous permettent de dire que le sol de la parcelle expérimentale présente un potentiel infectieux initial élevé (proche de 90% de maladie), et permettra une bonne appréciation de l'effet

assainissant des plantes de services à tester dans cet essai.

## 2. Evaluation en serre

L'expression des symptômes a été très faible en serre en comparaison au champ (**Figure 10**).



**Figure 10 :** Evolution de l'IFB en serre sur bioindicateurs tomate sur sol prélevé en D1 (temps initial).

Vingt-six jours après transplantation des tomates, l'indice de flétrissement bactérien est inférieur à 20% alors qu'à cette même date, il a atteint 80% en plein champ. Ce résultat surprenant nous amène à avancer différentes hypothèses :

- (i) Les fortes variations de température jour-nuit dans la serre pourraient perturber le développement de la maladie. En effet, la nuit, les températures avoisinaient 22°C tandis qu'en journée elles étaient en moyenne de 30°C. Ces écarts de température avec des nuits fraîches sont connus pour être des facteurs défavorables au développement du flétrissement bactérien.

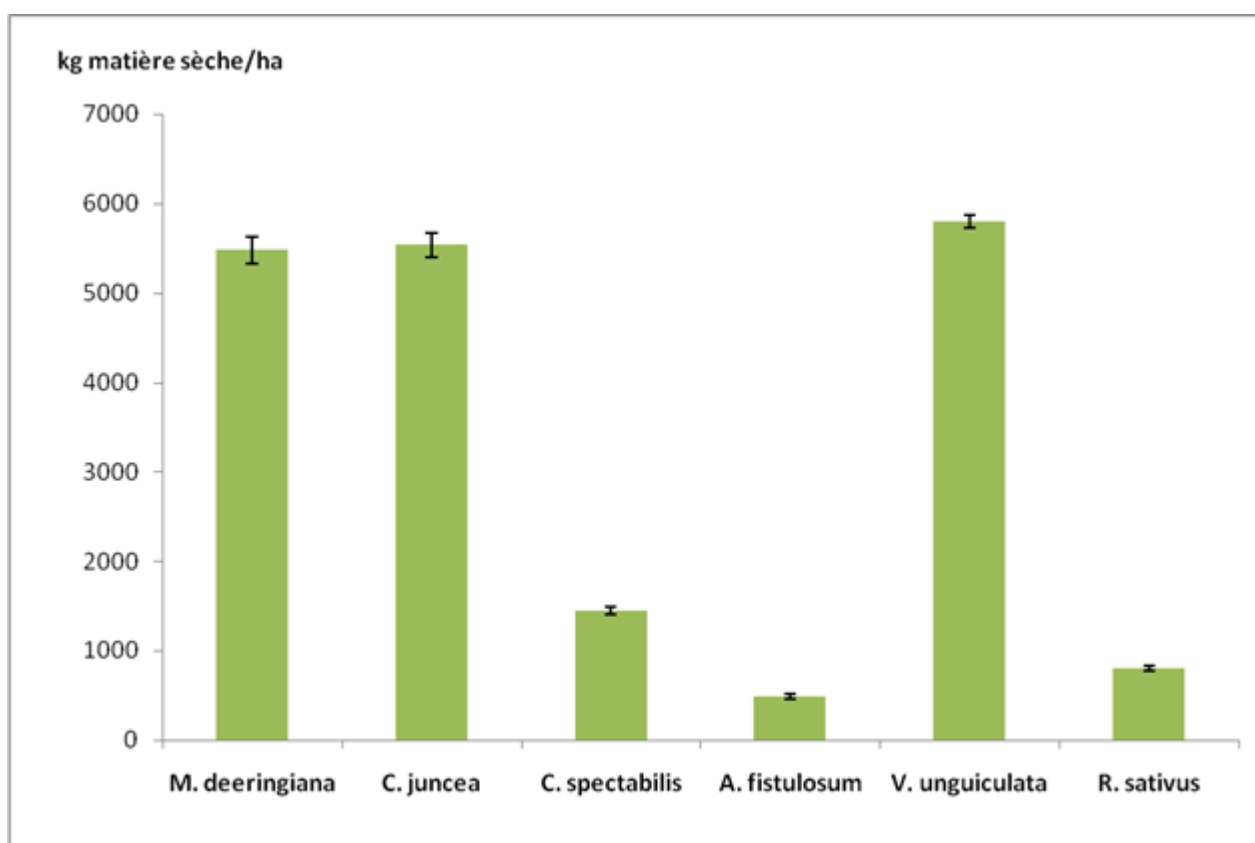
- (ii) La variété de tomate utilisée comme bio-indicatrice (cv. Heatmaster), qui est la même qu'utilisée en plein champ, aurait pu exprimer son fond génétique résistant en conditions défavorables à l'expression de la maladie. En effet, en plein champ, les tomates sont soumises à de multiples facteurs environnementaux que l'on ne contrôle pas, ce qui les expose plus fortement à la maladie.

La très faible expression de la maladie en serre n'a pas permis de révéler de différences statistiques entre les traitements ; Au vu de ces premiers résultats nous avons fait le choix de ne pas présenter les résultats de l'expérimentation en serre dans ce rapport.

Par conséquent, la suite des résultats portera uniquement sur l'expérimentation de plein champ.

## B. Production de biomasse par les plantes de services et teneur en azote minéral du sol

Des mesures de biomasse ont été effectuées sur les parties aériennes des différentes plantes de service testées afin d'estimer leur rendement. Les résultats sont présentés dans la **Figure 11**.



**Figure 11** : Quantité de matière sèche produite par les parties aériennes des différentes plantes de services à l'issue de la phase culturale (70 jours pour les PdS cycle long, 35 jours pour *R. sativus*).



Les espèces *M. deeringiana*, *C. juncea* et *V. unguiculata* présentent les rendements les plus élevés avec plus de 5 tonnes de matière sèche (MS) par hectare. *C. spectabilis* présentent un rendement faible. De plus, cette espèce a subi de fortes attaques fongiques au niveau du collet. Il a aussi été soumis à l'attaque de chenilles spécifiques de l'espèce et s'est montré peu tolérant aux fortes précipitations.

L'oignon pays (*A. fistulosum*) présente une faible biomasse au niveau des parties aériennes (inférieure à 1 tonne de matière sèche (MS) par hectare), bien que cette espèce est cultivée principalement pour son bulbe.

*R. sativus* présente un rendement assez faible avec en moyenne environ 800 kg MS/ha.

La teneur en azote minéral a été mesurée pour les différents traitements, au temps initial (D1), après la phase de croissance des plantes de services (D2) et à la fin du mulch (D3). Les traitements plantes de services cycle long et cycle court ont été analysés séparément. Les résultats des traitements PdS cycle long sont présentés dans le **Tableaux 2** ci-dessous.

Traitement	NH <sub>4</sub>				NO <sub>3</sub>			
	mg N . Kg sol sec <sup>-1</sup>				mg N . Kg sol sec <sup>-1</sup>			
	D1	D2	D3 NON BACHEES	D3 BACHEES	D1	D2	D3 NON BACHEES	D3 BACHEES
Sol nu	10,81 <sup>ab</sup>	12,13 <sup>a</sup>	12,57 <sup>a</sup>	10,87 <sup>a</sup>	4,85 <sup>a</sup>	3,36 <sup>ab</sup>	11,04 <sup>efg</sup>	14,85 <sup>defg</sup>
<i>M. deeringiana</i>	12,42 <sup>ab</sup>	15,03 <sup>a</sup>	10,82 <sup>a</sup>	11,24 <sup>a</sup>	3,87 <sup>a</sup>	3,17 <sup>ab</sup>	26,23 <sup>de</sup>	57,61 <sup>a</sup>
<i>C. juncea</i>	12,89 <sup>ab</sup>	14,70 <sup>a</sup>	12,60 <sup>a</sup>	9,79 <sup>a</sup>	4,29 <sup>a</sup>	3,52 <sup>ab</sup>	17,21 <sup>defg</sup>	43,45 <sup>abc</sup>
<i>C. spectabilis</i>	11,96 <sup>ab</sup>	14,49 <sup>a</sup>	10,48 <sup>a</sup>	9,24 <sup>a</sup>	4,68 <sup>a</sup>	2,22 <sup>b</sup>	7,15 <sup>fg</sup>	21,57 <sup>def</sup>
<i>A. fistulosum</i>	12,79 <sup>ab</sup>	14,64 <sup>a</sup>	11,61 <sup>a</sup>	10,50 <sup>a</sup>	4,40 <sup>a</sup>	2,13 <sup>b</sup>	4,08 <sup>g</sup>	30,86 <sup>bcd</sup>
<i>V. unguiculata</i>	10,16 <sup>b</sup>	16,28 <sup>a</sup>	10,99 <sup>a</sup>	12,62 <sup>a</sup>	5,10 <sup>a</sup>	3,83 <sup>ab</sup>	30,59 <sup>bcd</sup>	46,40 <sup>ab</sup>
Tomate	13,33 <sup>a</sup>	16,34 <sup>a</sup>	10,95 <sup>a</sup>	13,54 <sup>a</sup>	5,22 <sup>a</sup>	5,06 <sup>a</sup>	12,01 <sup>efg</sup>	27,35 <sup>cde</sup>

**Tableau 2** : Variabilité de la teneur en azote minéral du sol (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) à D1, D2, D3 pour les traitements plantes de services cycle long. Les valeurs de la même colonne ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les différentes lettre sont à analyser par dates séparément (D1, D2, D3) (Test de Tukey, p<0,05).

La quantité d'ammonium dans le sol varie peu entre les différentes dates et il n'existe pas de différences significatives entre les différents traitements excepté en D1 avec une différence entre les placettes de *V. unguiculata* et de tomates.

Concernant la quantité de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), les quantités sont homogènes sur la parcelle en D1 pour l'ensemble des traitements. En D2 les quantités sont globalement homogènes, avec une légère baisse par rapport à D1 du fait de l'utilisation par les plantes, et une différence entre *C. spectabilis* et le témoin tomate. Cette différence peut s'expliquer par une quantité de nitrates plus élevée sur les placettes témoin tomate du fait de la fertilisation effectuée durant les 2 cycles de culture lors de la phase 1. En D3 on remarque un fort apport des légumineuses les plus productives (*M. deeringiana*, *C. juncea* et *V. unguiculata*). L'apport de nitrate par *C. spectabilis* est faible, sûrement à cause de sa faible production de biomasse aérienne. On remarque également une différence entre les modalités bâchage et non bâchage pour la quantité de nitrates. En effet les quantités sont plus élevées après un paillage plastique. Cette différence s'explique par un lessivage du nitrate par les précipitations dans la modalité non bâchée, tandis que ce phénomène est atténué par la couverture plastique.

Ces résultats nous permettent également de confirmer le rôle d'engrais vert (à caractère fertilisant) des plantes telles que *M. deeringiana*, *C. juncea* et *V. unguiculata*.

Les teneurs en azote minéral du sol ont été analysées séparément pour la plante de cycle court *R. sativus*, du fait de son implantation plus tardive. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3** ci-dessous.

Traitement	NH <sub>4</sub>				NO <sub>3</sub>			
	mg N . Kg sol sec <sup>-1</sup>				mg N . Kg sol sec <sup>-1</sup>			
	D1	D2	D3 NON BACHE	D3 BACHE	D1	D2	D3 NON BACHE	D3 BACHE
Sol nu	5,13 <sup>a</sup>	11,31 <sup>a</sup>	14,07 <sup>a</sup>	9,20 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>	3,54 <sup>a</sup>	9,58 <sup>c</sup>	17,11 <sup>bc</sup>
<i>R. sativus</i>	6,37 <sup>a</sup>	18,24 <sup>a</sup>	12,72 <sup>a</sup>	12,12 <sup>a</sup>	11,49 <sup>a</sup>	5,07 <sup>a</sup>	14,15 <sup>c</sup>	49,42 <sup>a</sup>
Tomate	8,37 <sup>a</sup>	16,34 <sup>a</sup>	10,95 <sup>a</sup>	13,54 <sup>a</sup>	7,45 <sup>a</sup>	5,06 <sup>a</sup>	12,01 <sup>c</sup>	27,35 <sup>b</sup>

**Tableau 3** : Variabilité de la teneur en azote minéral du sol ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) à D1, D2, D3 pour le traitement plante de services cycle court. Les valeurs de la même colonne ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les différentes lettres sont à analyser par dates séparément (D1, D2, D3) (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Là aussi la quantité d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dans le sol varie peu entre les différentes dates et il n'existe pas de différences significatives entre les traitements.

La quantité de nitrate est homogène entre les traitements aux dates D1 et D2. A la date D3 il n'y a

pas de différences significatives entre les traitements pour la modalité sans bâchage. On retrouve l'atténuation du lessivage par le paillage plastique, et un potentiel « d'engrais vert » pour le radis fourrager puisque la quantité de nitrate est supérieure aux témoins sol nu et tomates après un bâchage.

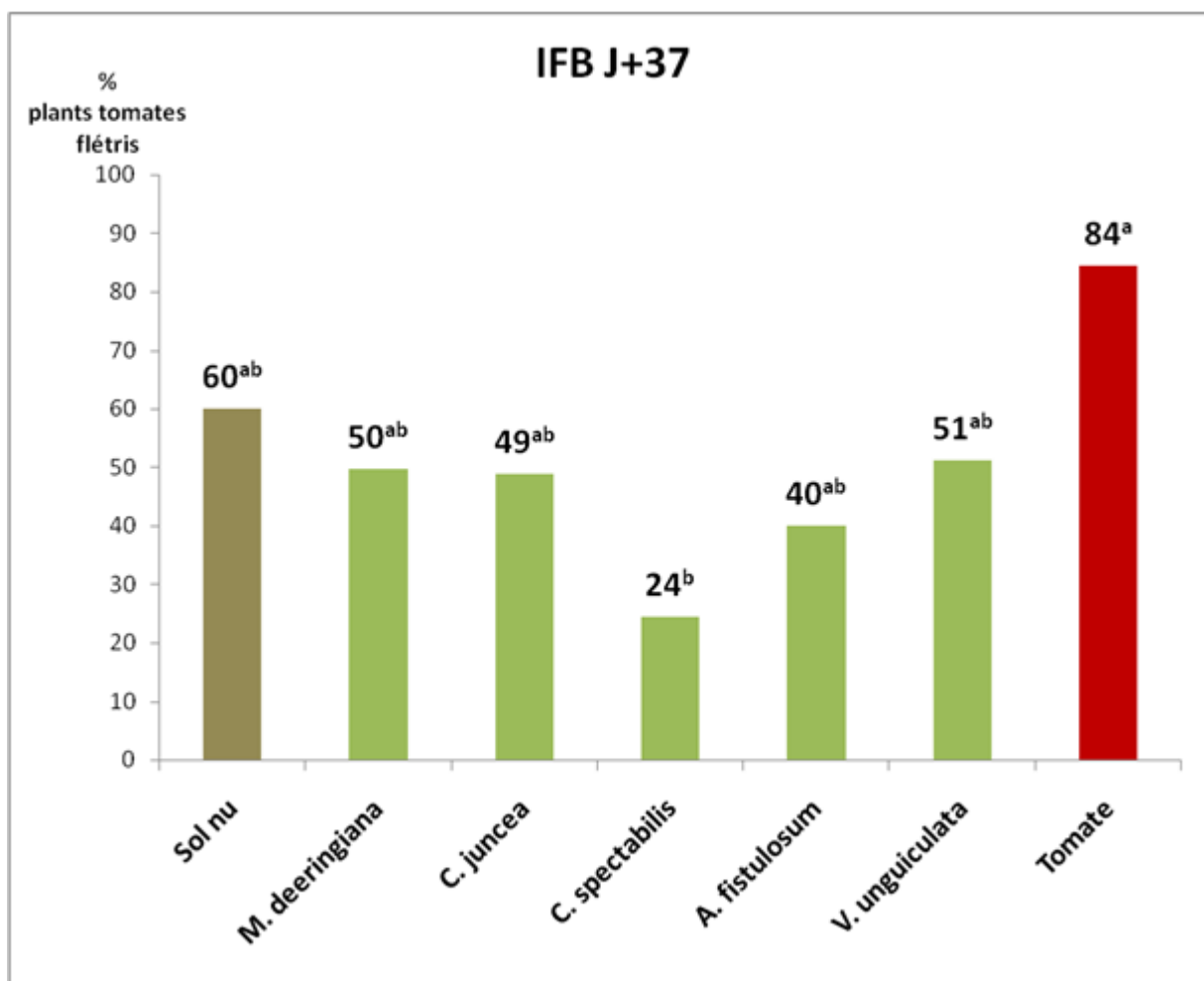
## **C. Evaluation du potentiel assainissant des plantes de services à cycle long**

Le potentiel assainissant des différentes plantes de services sur l'agent du flétrissement bactérien a été évalué par le suivi de la maladie sur le bio-indicateur tomate cv. Heatmaster, pendant 37 jours, suite à leur transplantation.

Les traitements PdS cycle long et cycle court ont été analysés séparément. Dans un premier temps les modalités « bâchage » et « non bâchage » ont également été analysés séparément.

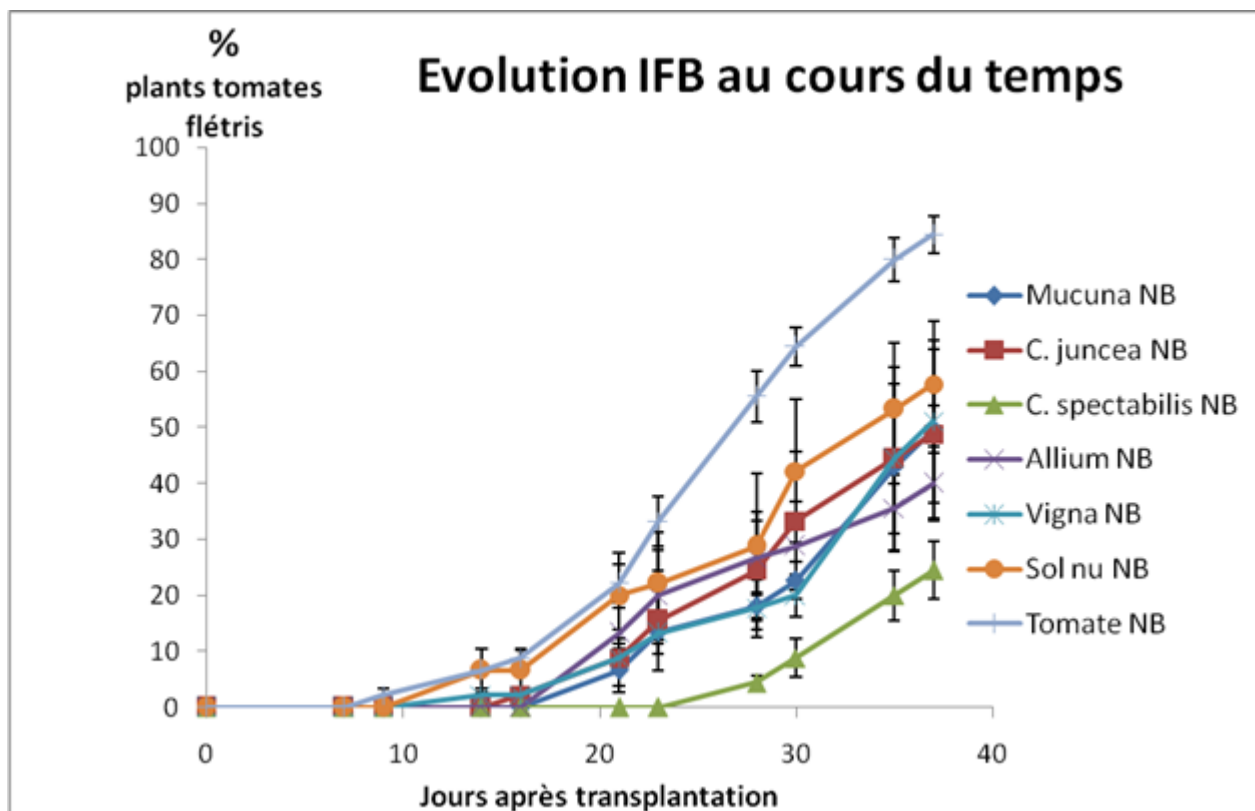
### **1. Modalité mulch seul**

Globalement, un effet plantes de service semble être visible puisque le taux de maladie avoisine les 50% pour les différents traitements plantes de services, contre 84% pour le traitement tomate (**Figure 12**).



**Figure 12** : Indices de flétrissement bactérien (IFB) à j+37 pour les traitements cycle long modalité non bâché. Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (test LSD,  $p < 0,05$ ).

Le traitement culture de *Crotalaria spectabilis* suivi d'un « mulch » réduit de façon significative l'incidence de la maladie après 37 jours, comparé à un précédent tomate. Cependant ce traitement ne diffère pas significativement du témoin sol nu.



**Figure 13** : Evolution de l'IFB au cours du temps pour les différents traitements cycle long, modalité non bâché.

L'analyse statistique des données AUDPC permet de distinguer le traitement *C. spectabilis* du traitement tomate. La sévérité de la maladie est donc réduite après un traitement *C. spectabilis*. En effet, sur les courbes d'évolution de la maladie, on remarque que les symptômes apparaissent une semaine après transplantation dans le traitement tomate tandis que dans le traitement *C. spectabilis* les symptômes apparaissent au bout de 28 jours et l'évolution de la maladie est moins rapide.

En modalité « non bâché », les analyses statistiques n'ont pas fait ressortir de différences significatives entre les PdS testées pour les mesures de flétrissement bactérien, aussi bien pour l'IFB que pour l'AUDPC. Cependant, on a pu remarquer une tendance forte à la réduction de la maladie pour *C. spectabilis*.

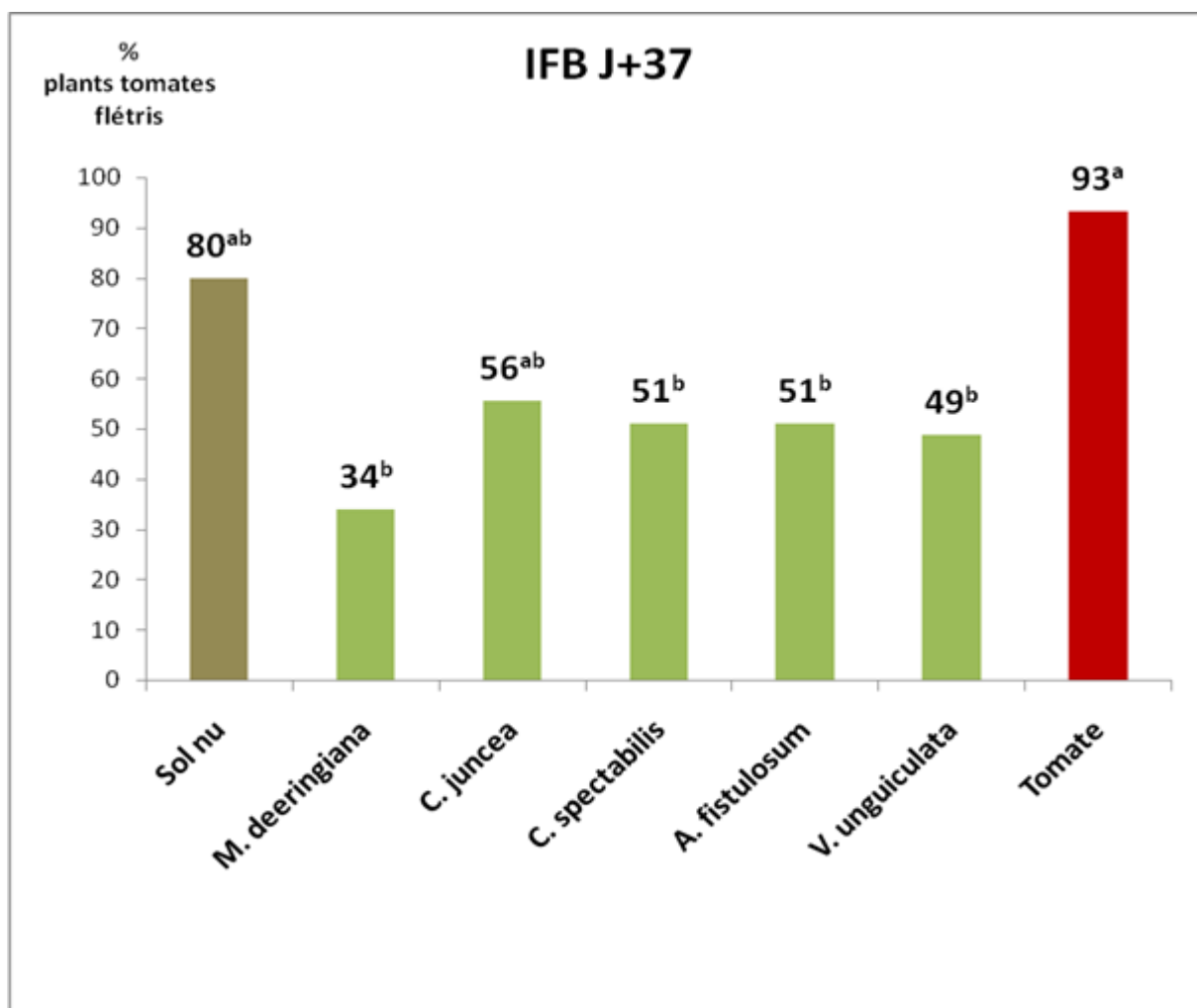
## 2. Modalité mulch + bâchage

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, le bâchage n'a pas d'effet suppressif sur la maladie, dans nos conditions expérimentales. Les taux de flétrissement sont plus élevés chez les témoins sol nu et tomate en modalité « mulch » + bâchage » comparé au « mulch » sans bâchage. Les plantes

de services semblent présenter un effet assainissant par rapport au témoin tomate (**Figure 14**). Les indices de flétrissement des différents traitements PdS sont du même ordre de grandeur que la modalité non bâché, avec un indice de flétrissement proche de 50%.

L'analyse statistique permet de distinguer statistiquement les traitements *C. spectabilis*, *A. fistulosum*, *V. unguiculata* et *M. deeringiana* du traitement tomate. Ceux-ci réduisent de façon significative l'incidence de la maladie par rapport au précédent tomate.

*M. deeringiana* semble présenter un potentiel assainissant plus important que les autres plantes de services puisqu'elle réduit le taux de flétrissement à 34%. Cependant cette valeur n'est pas significativement différente des valeurs obtenues pour les autres PdS.

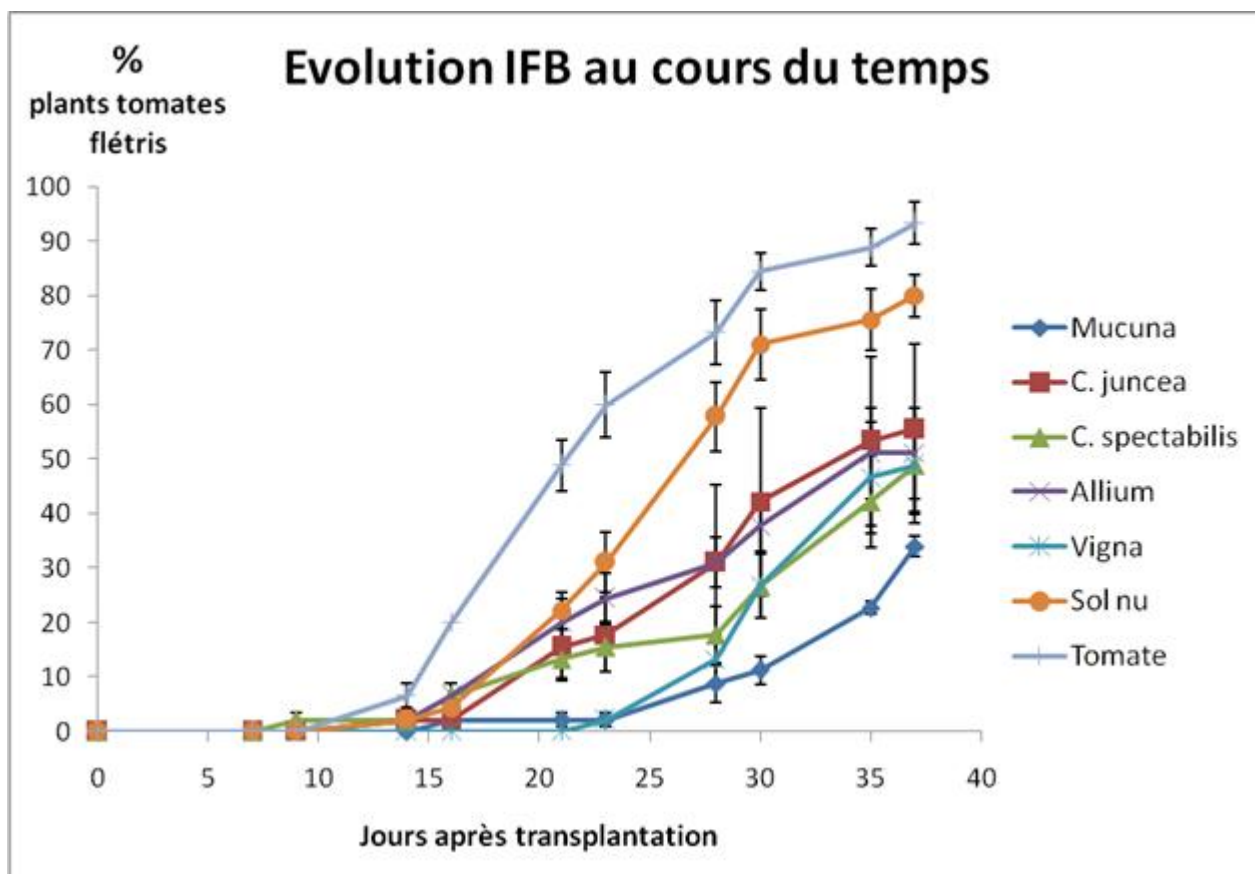


**Figure 14** : Comparaison des indices de flétrissement bactérien (IFB) à j+37 pour les traitements cycle long modalité bâché. Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (test LSD,  $p < 0,05$ )

L'analyse statistique des données AUDPC permet de distinguer les traitements *C. spectabilis*, *A.*

*fistulosum*, *V. unguiculata* et *M. deeringiana* du traitement tomate. La sévérité de la maladie est significativement plus faible pour ces traitements comparé au traitement tomate.

De plus la sévérité de la maladie est significativement plus faible après un traitement *M. deeringiana* par rapport au témoin tomate ainsi que par rapport au témoin sol nu. En effet sur les courbes d'évolution de la maladie (**Figure 15**), l'apparition des symptômes ne débute qu'au bout de 23 jours après transplantation de la tomate chez le traitement *M. deeringiana*.



**Figure 15** : Evolution de l'IFB au cours du temps pour les différents traitements cycle long modalité bâché.

En modalité « bâché », les analyses statistiques n'ont pas fait ressortir de différences significatives entre les PdS testées pour les mesures de flétrissement bactérien, aussi bien pour l'IFB que pour l'AUDPC. Cependant, on a pu remarquer une tendance forte à la réduction de la maladie pour *M. deeringiana*.

## D. L'état biologique du sol via l'analyse des activités enzymatiques – plantes de services cycle long

Le suivi de l'état biologique du sol et son évolution aux différentes phases des traitements « plantes de service » a été réalisé par l'analyse des activités de quatre enzymes du sol.

Les mesures de ces activités ont été réalisées aux différentes dates clés de l'essai en plein champ (D1, D2 et D3). Une ANOVA est réalisée avec le logiciel XLSTAT, en prenant en compte l'effet traitement et l'effet bloc.

### 1. FDA

Les résultats sont visibles dans le **Tableau 4 ci-dessous**.

Traitement	Activité FDA $\mu\text{g FDA h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$			
	D1	D2	D3 NON BACHEES	D3 BACHEES
Sol nu	0,22 <sup>a</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>
<i>M. deeringiana</i>	0,27 <sup>a</sup>	0,23 <sup>ab</sup>	0,21 <sup>ab</sup>	0,23 <sup>ab</sup>
<i>C. juncea</i>	0,17 <sup>a</sup>	0,23 <sup>ab</sup>	0,20 <sup>ab</sup>	0,13 <sup>b</sup>
<i>C. spectabilis</i>	0,21 <sup>a</sup>	0,20 <sup>ab</sup>	0,21 <sup>ab</sup>	0,23 <sup>ab</sup>
<i>A. fistulosum</i>	0,17 <sup>a</sup>	0,24 <sup>ab</sup>	0,23 <sup>ab</sup>	0,27 <sup>a</sup>
<i>V. unguiculata</i>	0,31 <sup>a</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>
Tomate	0,29 <sup>a</sup>	0,19 <sup>ab</sup>	0,22 <sup>ab</sup>	0,24 <sup>a</sup>

**Tableau 4** : Variabilité de l'activité FDA à D1, D2, D3 pour le traitement plante de services cycle long. Les valeurs de la même colonne ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les différentes lettre sont à analyser par dates séparément (D1, D2, D3) (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

En D1 les valeurs sont relativement homogènes.

En D2, si on note une différence significative entre le témoin sol nu et *V. unguiculata*, on ne remarque pas différences significatives entre les traitements PdS.

En D3 les valeurs sont aussi relativement homogènes, cependant le *C. juncea* bâché possède une activité FDA significativement plus faible que certains traitements (dont tomate bâchée, *V.*



*unguiculata*, *A. fistulosum*, sol nu).

Les plantes retenues pour leur pouvoir assainissant sur la maladie (*C. spectabilis* et *M. deeringiana*) ne se distinguent pas au niveau de l'activité enzymatique FDA.

## 2. $\beta$ -glucosidase

Les résultats sont visibles dans le **Tableau 5** ci-dessous..

Traitement	Activité Bétaglucosidase $\mu\text{g pNp h}^{-1} \text{g}^{-1}$			
	D1	D2	D3 NON BACHEES	D3 BACHEES
Sol nu	89,18 <sup>a</sup>	37,65 <sup>a</sup>	59,74 <sup>ab</sup>	48,82 <sup>b</sup>
<i>M. deeringiana</i>	65,80 <sup>a</sup>	53,61 <sup>a</sup>	77,70 <sup>ab</sup>	63,13 <sup>ab</sup>
<i>C. juncea</i>	69,44 <sup>a</sup>	50,98 <sup>a</sup>	77,52 <sup>ab</sup>	59,21 <sup>ab</sup>
<i>C. spectabilis</i>	67,50 <sup>a</sup>	43,70 <sup>a</sup>	76,44 <sup>ab</sup>	61,74 <sup>ab</sup>
<i>A. fistulosum</i>	102,42 <sup>a</sup>	48,59 <sup>a</sup>	82,10 <sup>ab</sup>	62,25 <sup>ab</sup>
<i>V. unguiculata</i>	97,21 <sup>a</sup>	46,02 <sup>a</sup>	88,36 <sup>a</sup>	56,73 <sup>ab</sup>
Tomate	100,30 <sup>a</sup>	50,82 <sup>a</sup>	53,48 <sup>b</sup>	52,42 <sup>b</sup>

**Tableau 5** : Variabilité de l'activité bétaglucosidase à D1, D2, D3 pour le traitement plante de services cycle long. Les valeurs de la même colonne ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les différentes lettre sont à analyser par dates séparément (D1, D2, D3) (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

En D1 les valeurs sont relativement homogènes entre les traitements, ainsi qu'en D2. Une baisse de l'activité peut être notée entre D1 et D2.

En D3, on note une activité significativement plus élevée de *V. unguiculata* par rapport au témoin tomate et au témoin sol nu bâché.

L'activité enzymatique semble plus faible de manière globale dans la modalité bâchage comparée à la modalité sans bâchage, mais pas de façon significative. Cela peut s'expliquer, un peu comme pour le nitrate plus haut, par un moindre apport de la matière organique vers le sol du fait de la protection du mulch par le paillage plastique lors des précipitations.

### 3. Arylsulfatase

Les résultats sont visibles dans le **Tableau 6** ci-dessous.

Activité Arylsulfatase				
$\mu\text{g pNp h}^{-1} \text{g}^{-1}$				
Traitement	D1	D2	D3 NON BACHEES	D3 BACHEES
Sol nu	133,53 <sup>a</sup>	84,40 <sup>a</sup>	116,67 <sup>a</sup>	89,44 <sup>a</sup>
<i>M. deeringiana</i>	111,31 <sup>a</sup>	84,33 <sup>a</sup>	83,20 <sup>a</sup>	79,50 <sup>a</sup>
<i>C. juncea</i>	127,43 <sup>a</sup>	99,65 <sup>a</sup>	110,40 <sup>a</sup>	103,96 <sup>a</sup>
<i>C. spectabilis</i>	141,13 <sup>a</sup>	83,50 <sup>a</sup>	129,17 <sup>a</sup>	87,61 <sup>a</sup>
<i>A. fistulosum</i>	117,64 <sup>a</sup>	91,05 <sup>a</sup>	129,24 <sup>a</sup>	91,23 <sup>a</sup>
<i>V. unguiculata</i>	145,05 <sup>a</sup>	90,64 <sup>a</sup>	103,76 <sup>a</sup>	90,25 <sup>a</sup>
Tomate	140,63 <sup>a</sup>	88,18 <sup>a</sup>	100,22 <sup>a</sup>	98,90 <sup>a</sup>

**Tableau 6** : Variabilité de l'activité Arylsulfatase à D1, D2, D3 pour le traitement plante de services cycle long. Les valeurs de la même colonne ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les différentes lettres sont à analyser par dates séparément (D1, D2, D3) (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Les valeurs sont homogènes entre les traitements, aux différentes dates. On ne note pas de différences significatives dans l'activité enzymatique Arylsulphatase entre les différents traitements.

## 4. Chitinase

Les résultats sont visibles dans le **Tableau 7** ci-dessous..

Traitement	Activité Chitinase $\mu\text{g pNp h}^{-1} \text{g}^{-1}$			
	D1	D2	D3 NON BACHEES	D3 BACHEES
Sol nu	28,43 <sup>a</sup>	26,21 <sup>a</sup>	34,26 <sup>ab</sup>	33,67 <sup>ab</sup>
<i>M. deeringiana</i>	34,68 <sup>a</sup>	27,83 <sup>a</sup>	35,99 <sup>ab</sup>	37,00 <sup>ab</sup>
<i>C. juncea</i>	34,62 <sup>a</sup>	34,57 <sup>a</sup>	41,74 <sup>ab</sup>	35,97 <sup>ab</sup>
<i>C. spectabilis</i>	37,99 <sup>a</sup>	27,48 <sup>a</sup>	37,32 <sup>ab</sup>	34,13 <sup>ab</sup>
<i>A. fistulosum</i>	30,53 <sup>a</sup>	28,21 <sup>a</sup>	49,12 <sup>a</sup>	44,11 <sup>ab</sup>
<i>V. unguiculata</i>	27,48 <sup>a</sup>	33,80 <sup>a</sup>	35,86 <sup>ab</sup>	33,58 <sup>ab</sup>
Tomate	31,56 <sup>a</sup>	28,72 <sup>a</sup>	34,87 <sup>ab</sup>	28,56 <sup>b</sup>

**Tableau 7** : Variabilité de l'activité chitinase à D1, D2, D3 pour le traitement plante de services cycle long. Les valeurs de la même colonne ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les différentes lettre sont à analyser par dates séparément (D1, D2, D3) (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Les valeurs sont homogènes entre les traitements en D1 et D2.

En D3, l'activité de l'oignon péyi non bâché est significativement plus élevée que le témoin tomate bâché. L'oignon péyi semble posséder une activité chitinase légèrement plus élevée par rapport aux autres traitements, mais pas de manière significative. Cela peut s'expliquer par le fort potentiel mycorhizotrophe et peut être une population de champignons mycorhizogènes, riches en chitinase, plus élevée sur ces placettes.

Cependant, là encore les plantes retenues pour leur pouvoir assainissant sur la maladie (*C. spectabilis* et *M. deeringiana*) ne se distinguent pas au niveau de l'activité enzymatique Chitinase.

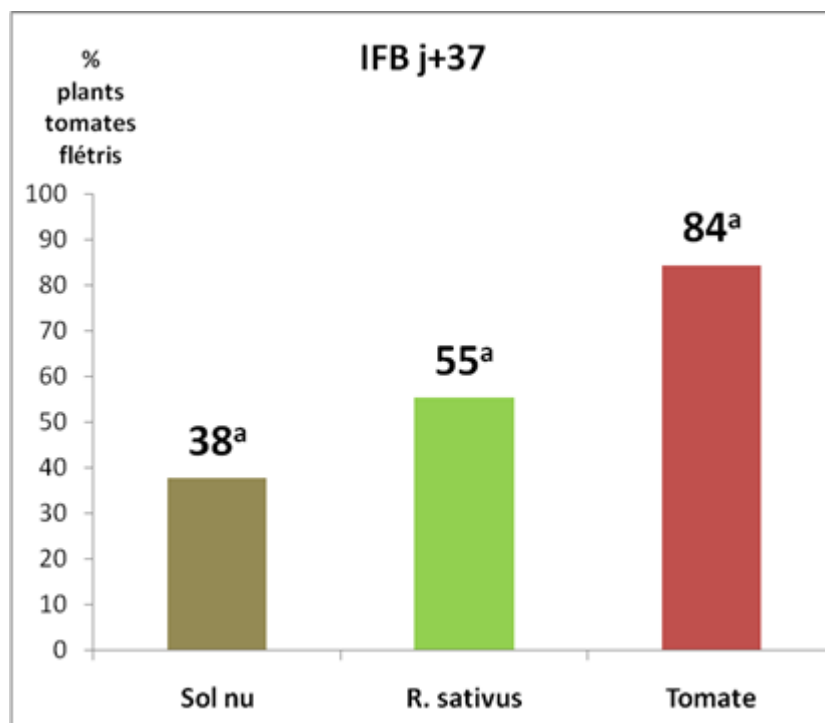
## E. Evaluation du potentiel assainissant d'une plante de service à cycle court, *Raphanus sativus*

L'analyse du potentiel assainissant du radis fourrager a été effectuée de la même manière que pour les plantes de services à cycle long. Les modalités bâchage ou non-bâchage ont été analysées

séparément.

## 1. Modalité mulch seul

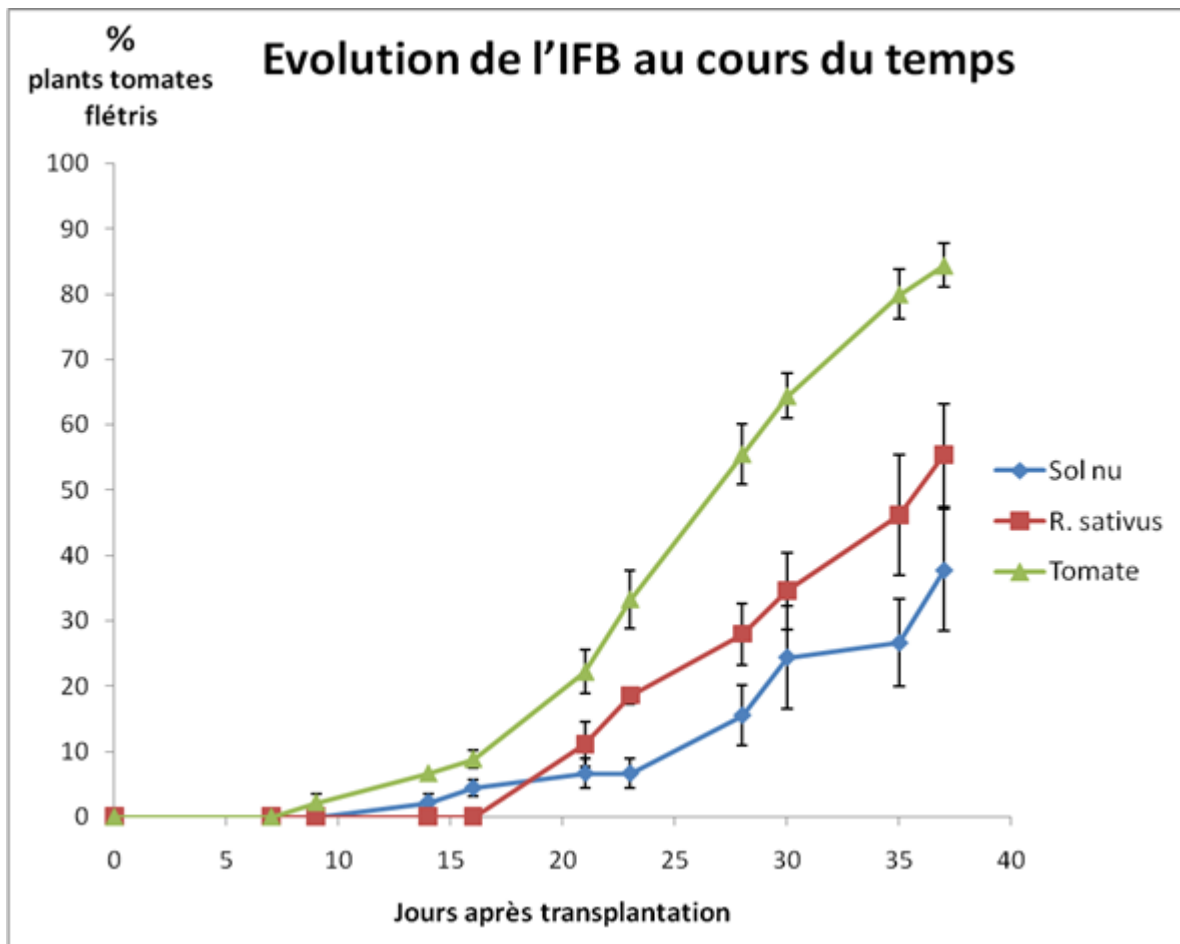
L'incidence du flétrissement bactérien 37 jours après transplantation des tomates ne diffère pas de façon significative entre les 3 traitements (**Figure 16**)



**Figure 16** : Comparaison des indices de flétrissement bactérien (IFB) à j+37 pour le traitement plante de services cycle court, modalité non-bâchée. Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (test LSD,  $p < 0,05$ )

Même s'ils ne se distinguent pas de façon significative, le pourcentage de plants flétris est en moyenne plus élevé chez le traitement *R. sativus* par rapport au témoin sol nu.

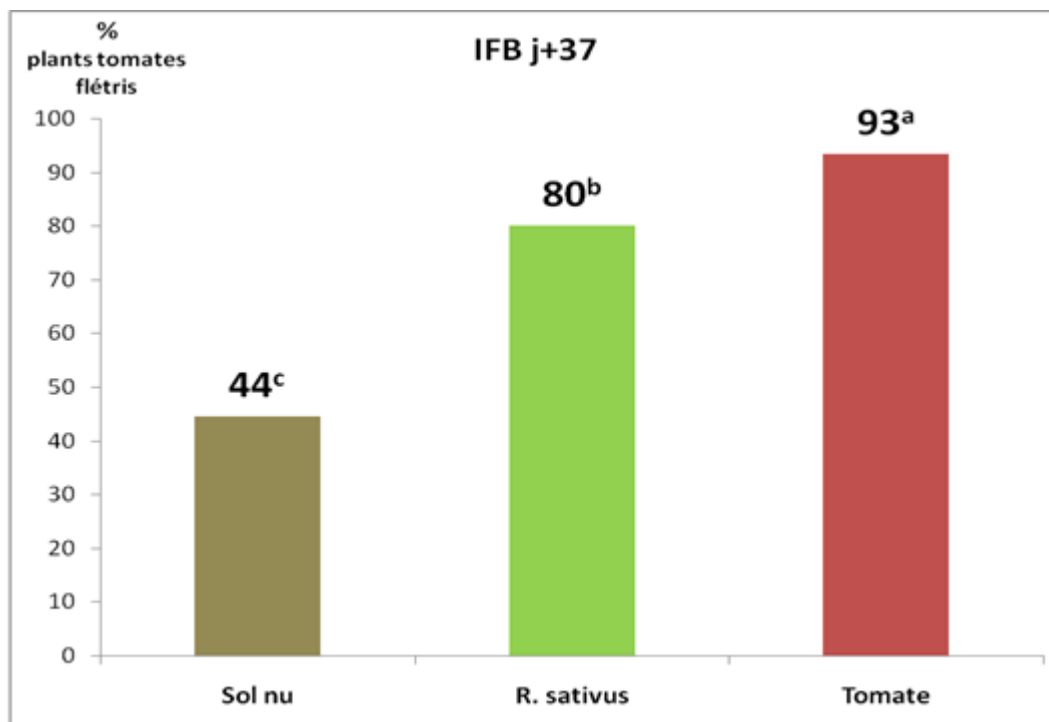
Concernant la sévérité de la maladie caractérisée par l'AUDPC, celle-ci est significativement plus faible chez le traitement *R. sativus* par rapport au témoin tomate. Cependant elle est significativement plus élevée par rapport au témoin sol nu (**Figure 17**)



**Figure 17** : Evolution de l'IFB au cours du temps pour le traitement plante de services cycle court, modalité non-bâchée.

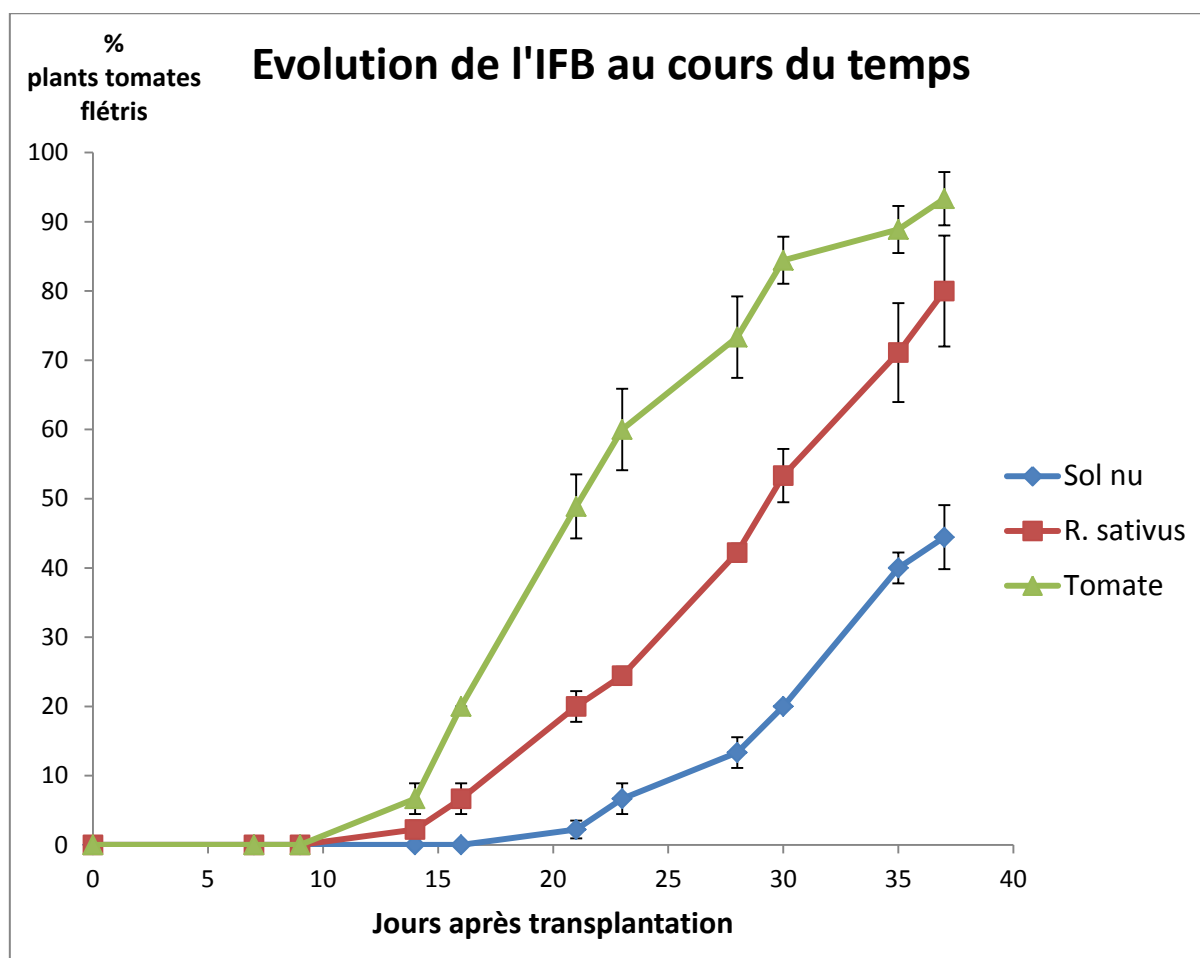
## 2. Modalité mulch + bâchage

La modalité bâchage semble accentuer les effets des traitements, et l'incidence de la maladie après traitement *R. sativus* est significativement plus faible par rapport au témoin tomate. Mais elle est significativement plus élevée par rapport au témoin sol nu (**Figure 18**).



**Figure 18** : Comparaison des indices de flétrissement bactérien (IFB) à j+37 pour le traitement plante de services cycle court, modalité bâchée. Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (test LSD,  $p < 0,05$ )

On retrouve le même ordre dans les traitements par rapport à la sévérité de la maladie, avec une sévérité significativement plus faible chez *R. sativus* par rapport au témoin tomate, mais significativement plus élevée par rapport au témoin sol nu (**Figure 19**).



**Figure 19** : Evolution de l'IFB au cours du temps pour le traitement plante de services cycle court, modalité bâchée.

## F. L'état biologique du sol via l'analyse des activités enzymatiques – plante de services cycle court

Les méthodes d'analyse sont les mêmes que pour les PdS cycle long et les résultats sont présentés ci-après.

## 1. FDA

Les résultats sont visibles dans le **Tableau 8 ci-dessous**.

### Activité FDA

$\mu\text{g FDA h}^{-1} \text{ g}^{-1}$

Traitement	D1	D2	D3 NON BACHE	D3 BACHE
Sol nu CC	0,08 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,12 <sup>b</sup>	0,23 <sup>ab</sup>
<i>R. sativus</i>	0,11 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,15 <sup>ab</sup>
Tomate	0,14 <sup>a</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,22 <sup>ab</sup>	0,24 <sup>ab</sup>

**Tableau 8** : Variabilité de l'activité FDA à D1, D2, D3 pour le traitement plante de services cycle court. Les valeurs de la même colonne ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les différentes lettre sont à analyser par dates séparément (D1, D2, D3) (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

En D1 et D2, l'activité est relativement homogène entre les différents traitements.

En D3, l'activité est significativement plus élevée chez *R. sativus* non bâché par rapport au témoin sol nu. On n'observe pas de différences significatives entre les modalités bâchage ou non bâchage.

## 2. $\beta$ -glucosidase

Les résultats sont visibles dans le **Tableau 9 ci-dessous**.

### Activité Bétaglucosidase

$\mu\text{g pNp h}^{-1} \text{ g}^{-1}$

Traitement	D1	D2	D3 NON BACHE	D3 BACHE
Sol nu CC	50,11 <sup>a</sup>	39,39 <sup>a</sup>	59,42 <sup>a</sup>	51,85 <sup>a</sup>
<i>R. sativus</i>	47,38 <sup>a</sup>	48,81 <sup>a</sup>	49,95 <sup>a</sup>	54,64 <sup>a</sup>
Tomate	47,97 <sup>a</sup>	50,82 <sup>a</sup>	53,48 <sup>a</sup>	52,42 <sup>a</sup>

**Tableau 9** : Variabilité de l'activité Bétaglucosidase à D1, D2, D3 pour le traitement plante de services cycle court. Les valeurs de la même colonne ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les différentes lettre sont à analyser par dates séparément (D1, D2, D3) (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).



Les valeurs sont homogènes entre les traitements, aux différentes dates. On ne note pas de différences significatives entre la PdS et les témoins.

### 3. Arylsulfatase

Les résultats sont visibles dans le **Tableau 10 ci-dessous**.

#### Activité Arylsulfatase

$$\mu\text{g pNp h}^{-1} \text{ g}^{-1}$$

Traitement	D1	D2	D3 NON BACHE	D3 BACHE
Sol nu CC	77,22 <sup>a</sup>	80,71 <sup>a</sup>	136,87 <sup>a</sup>	102,03 <sup>a</sup>
<i>R. sativus</i>	78,49 <sup>a</sup>	77,19 <sup>a</sup>	118,41 <sup>a</sup>	87,77 <sup>a</sup>
Tomate	66,92 <sup>a</sup>	88,18 <sup>a</sup>	100,22 <sup>a</sup>	98,90 <sup>a</sup>

**Tableau 10** : Variabilité de l'activité Arylsulfatase à D1, D2, D3 pour le traitement plante de services cycle court. Les valeurs de la même colonne ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les différentes lettre sont à analyser par dates séparément (D1, D2, D3) (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Les valeurs sont homogènes entre les traitements, aux différentes dates. On ne note pas de différences significatives entre la PdS et les témoins.

### 4. Chitinase

Les résultats sont visibles dans le **Tableau 11 ci-dessous**.

#### Activité Chitinase

$$\mu\text{g pNp h}^{-1} \text{ g}^{-1}$$

Traitement	D1	D2	D3 NON BACHE	D3 BACHE
Sol nu CC	27,76 <sup>a</sup>	26,45 <sup>a</sup>	34,48 <sup>a</sup>	29,69 <sup>a</sup>
<i>R. sativus</i>	27,83 <sup>a</sup>	32,17 <sup>a</sup>	34,49 <sup>a</sup>	32,25 <sup>a</sup>
Tomate	26,70 <sup>a</sup>	28,72 <sup>a</sup>	34,87 <sup>a</sup>	28,56 <sup>a</sup>

**Tableau 11** : Variabilité de l'activité Chitinase à D1, D2, D3 pour le traitement plante de services cycle court. Les valeurs de la même colonne ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les

différentes lettres sont à analyser par dates séparément (D1, D2, D3) (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Les valeurs sont homogènes entre les traitements, aux différentes dates. On ne note pas de différences significatives entre la PdS et les témoins.

## **PARTIE 4 : Conclusion & perspectives**

La plante à cycle court *R. sativus* n'a pas montré de potentiel assainissant par rapport au sol nu et ne présente donc que peu d'intérêt pour les agriculteurs.

Parmi les plantes de services à cycle long, *C. spectabilis* et *M. deeringiana* semblent présenter un potentiel assainissant intéressant, mais les raisons de cette efficacité restent à élucider. Si l'analyse des activités enzymatiques a fourni peu de pistes pour la compréhension des mécanismes d'action impliqués, il est possible que les profils des populations microbiennes et leur évolution au cours du temps permettent d'expliquer nos résultats. Charlotte MOISY (2012) a montré que les plants de tomates présentaient un haut taux de mycorhizes lorsqu'ils étaient implantés après une culture de *C. spectabilis*. Ceci pourrait expliquer en partie l'efficacité de cette plante de service introduite dans le système de culture et indiquerait que son système racinaire puisse jouer un rôle prépondérant, sa production de biomasse aérienne étant plutôt faible comparée aux autres légumineuses testées dans notre étude. Les résultats obtenus ici devront être comparés à ceux qui seront obtenus dans le cadre de l'étude sur les mycorhizes, en effectuant des analyses multivariées.

Cet essai sera reconduit durant la saison 2012 – 2013 afin de valider ces résultats.

Si les blocs n'ont pas montré de différences au niveau statistique, une zone de la parcelle a semblé être plus fortement infestée. L'espèce *C. juncea* a montré un potentiel à réduire l'impact de la maladie dans les zones les moins infestées, tandis qu'en zone fortement infestée, sa capacité de contrôle a été fortement réduite. Ce phénomène pourrait révéler un potentiel assainissant qui s'exprimerait en fonction du niveau d'infestation du sol en *R. solanacearum*, et un seuil au-delà duquel la plante de service deviendrait inefficace.

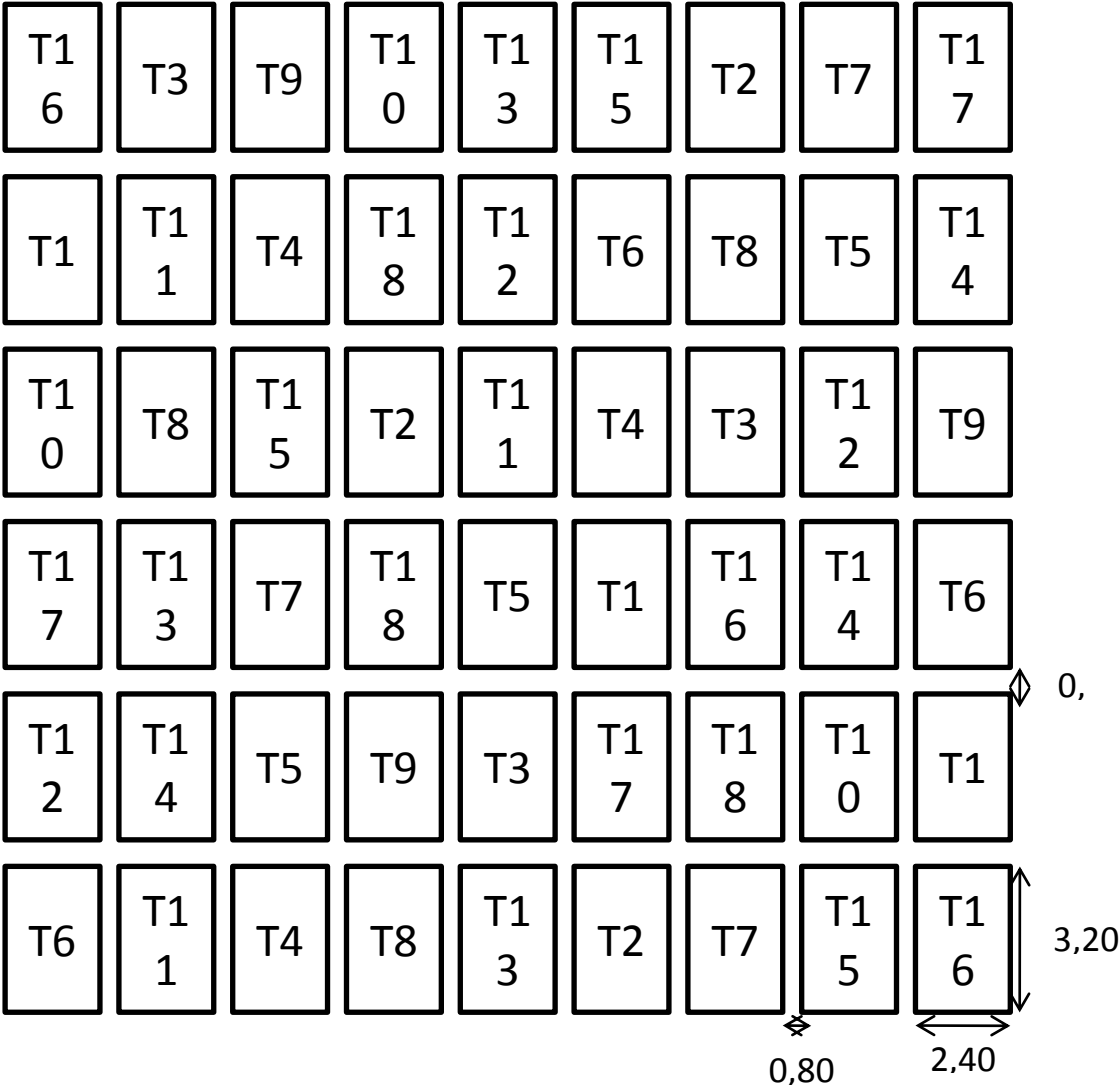
Afin de définir le meilleur design PdS-tomate, les plantes candidates devront aussi être testées sur d'autres types de sol, où les dynamiques de la maladie peuvent différer de celles observées au cours de cet essai. Des essais multilocaux seront programmés en conditions réelles chez les agriculteurs biologiques/agroécologiques au cours des saisons 2012 et 2013.

## **PARTIE 5: Bibliographie**

- Adebayo O.S., Kintomo A.A. and Fadamiro H.Y. 2009. Control of bacterial wilt disease of tomato through integrated crop management strategies. *International Journal of Vegetable Science*, 15:96 – 105.
- Ayana G., Fininsa C., Ahmed S., Wydra K. 2010. Effect of soil amendment on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and tomato yields in Ethiopia. *Journal of plant protection research*.
- Cardoso, S.C.; Soares, A.C.F.; Brito, A. dos S.; Laranjeira, F.F.; Ledo, C.A.S.; Santos, A.P. 2006. Control of tomato bacterial wilt through the incorporation of aerial part of pigeon pea and crotalaria to soil. *Summa Phytopathologica*, v.32, p. 27-33
- Islam, Tajul MD, Koki Toyota. 2004. « Suppression of bacterial wilt of tomato by *Ralstonia solanacearum* by incorporation of composts in soil and possible mechanisms ». *Microbes Environ*.
- Matthiessen, John, et John Kirkegaard. 2006. « Biofumigation and Enhanced Biodegradation: Opportunity and Challenge in Soilborne Pest and Disease Management ». *Critical Reviews in Plant Sciences* 25 (3) (juillet 1): 235–265. doi:10.1080/07352680600611543.
- Michel, V.V. and TW Mew. 1998. « Effect of a soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils ». *Phytopathology* 88 (4): 300–305.
- Michel V.V., Hartman G.L. and Midmore D.J. 1996. Effect of previous crop on soil populations of *Burkholderia solanacearum*, bacterial wilt, and yield of tomatoes in Taiwan. *Plant Dis.* 80:1367-1372.
- Michel V.V., Wang J.F., Midmore D.J. and Hartman G.L. 1997. Effects of intercropping and soil amendment with urea and calcium oxide on the incidence of bacterial wilt of tomato and survival of soil-borne *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant pathology* 46, 600 – 610
- Moisy C. stage 2011-2012. Introduction de plantes mycorrhizotrophes dans les systèmes de culture à base de tomate pour la bioprotection des racines in situ.
- Rodriguez-Ka'bana, R., Kloepper, J. W., Robertson, D. G., and Wells, L. W. 1992. Velvetbean for the management of root-knot and southern blight in peanut. *Nematropica* **22**, 75–80.
- Terblanche, J., and de Villiers, D. A. 1998. The suppression of *Ralstonia solanacearum* by Marigolds. Pages 325-331 in: *Bacterial wilt : Molecular and Ecological Aspects*, P. Prior, C. Allen and J. G. Elphinstone, eds. INRA Editions, Paris & Springer Verlag, Germany, Berlin.
- Vargas-Ayala, R., R. Rodríguez-Kábana, G. Morgan-Jones, J.A. McInroy, et J.W. Kloepper. 2000. « Shifts in soil microflora induced by velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in cropping systems to control root-knot nematodes ». *Biological Control* 17 (1): 11–22.
- Yu, J.Q. 1999. « Allelopathic suppression of *Pseudomonas solanacearum* infection of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in a tomato-chinese chive (*Allium tuberosum*) intercropping system ». *Journal of chemical ecology* 25 (11): 2409–2417.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., and Prior, P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French west Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (21):6790-6801.

## **PARTIE 6 : Annexes**

**Annexe 1** : Plan de la parcelle, station expérimentale Rivière Lézarde





**Annexe 2** : Modalités de semis des plantes de services

<b>Nom</b>	<b>Entre rangs (cm)</b>	<b>Sur le rang</b>	<b>Nombre de graines/ml</b>	<b>Profondeu r</b>	<b>Nbre graines par trou</b>	<b>Nombre de graines/2,40 m</b>
Raphanus 9713	20		55,8	1,5		134
Oignon pays	20	10	8,33			20
Mucuna(singapour)	40	12,5	6,6	4	2	32
Crotalariajuncea( Brésil)	40	4	20,83	2		50
CrotalariaSpectabilis	40	3	27,5	2		66
Vigna	40	10	8,33	4	2	40

**Annexe 3** : Engrais utilisés pour la croissance des plantes de service et de la tomate Heatmaster en plein champ

**Engrais pour les PdS lors de la mise en place de l'essai**

<b>Dose / 7,68m<sup>2</sup></b>	<b>Guano(6-3-9) (g)</b>	<b>Sulpomag (g)</b>	<b>Phosphate naturel (g)</b>
Brassicacée	768	384,00	0,77
Légumineuses	0	243,84	204,77
Total/g /essai/brassicacée	9216	4 608,00	9,22
Total/g /essai/légumineuse	0	5 852,16	4 914,43
Total en g	9216	10 460,16	4 923,65

**Cas spécifique de la tomate**

<b>Pour placette de 7,68m<sup>2</sup></b>	<b>Guano (kg)</b>	<b>Sulpomag (kg)</b>	<b>Phosphate naturel (kg)</b>
Avant plantation	1,22	0,56	0,31
En cours de plantation	1,15	0,17	0

## **Annexe 4** : Protocoles d'activités enzymatiques simplifiés

### **1) Hydrolyse de la fluorescéine di-acétate (FDA)**

La FDA est hydrolysée en un composé fluorescent (fluorescéine) par des estérases non spécifiques et on mesure la quantité de fluorescéine libérée est déterminée par colorimétrie faisant suite à une extraction avec un mélange de solvant organique.

#### ☐ Préparation des échantillons

0.5g de terre est placée dans des tubes Falcon. 3 répétitions sont réalisées, plus un témoin. On ajoute du tampon phosphate de sodium ainsi que de la solution de substrat lipase. Pour le témoin, on ajoute de l'acétone au lieu de la solution substrat.

Un échantillon « blanc » est réalisé par série, et contient les mêmes produits que les échantillons, sans la terre.

Tous les tubes sont agités puis mis dans un incubateur à 37°C durant 3h.

#### ☐ Analyse par colorimétrie

De l'acétone permet d'arrêter la réaction. Les échantillons sont ensuite centrifugés, et l'on filtre pour récupérer le surnageant, avant de lire la mesure d'absorbance par spectrophotométrie. Les données sont enregistrées sur clé USB et exportées en fichier .csv.

### **2) B-glucosidase :**

Cette méthode est basée sur une détermination colorimétrique du p-nitrophénol libéré par la  $\beta$ -glucosidase quand le sol est incubé avec du p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucoside tamponné. Le p-nitrophénol libéré est extrait par filtration et déterminé par colorimétrie.

#### ☐ Préparation des échantillons

1g de sol est pesé pour les échantillons et le témoin. Du toluène, MUB2 et de la solution de substrat PNG sont ajoutés (pas de solution substrat pour le témoin). Un blanc est préparé. L'ensemble des échantillons est agité et placé à l'incubateur à 37°C durant 1h.

#### ☐ Analyse par colorimétrie

51

A la fin de l'incubation, du  $\text{CaCl}_2$  permet d'arrêter la réaction. Du tampon THAM2 est ajouté, et le

contenant est filtré et l'on transfère le filtrat dans des cuves pour lecture par spectrophotométrie.

### **3) Arylsulfatase :**

Le para-nitrophénol libéré par l'activité de l'arylsulfatase est extrait puis coloré avec de l'hydroxyde de sodium et déterminé par photométrie.

☐ Préparation des échantillons

Les échantillons contiennent 1g de sol (sauf le blanc), du tampon acétate et de la solution substrat. Les témoins contiennent seulement de la terre et du tampon acétate. L'ensemble des échantillons est agité et placé dans l'incubateur à 37°C pendant 1h.

☐ Analyse par colorimétrie

Du  $\text{CaCl}_2$  permet d'arrêter la réaction. L'ajout de NaOH colore la solution obtenue qui, après filtration, est transférée dans des cuves de spectrophotométrie.

### **4) Chitinase :**

Cette méthode est basée sur une détermination colorimétrique du p-nitrophénol libéré par la chitinase. Une suspension de sol est incubée avec du n-acétyl-D-glucosamine et le p-nitrophénol libéré est extrait par filtration et déterminé par spectrophotométrie. Les résultats sont exportés en fichier .csv.

☐ Préparation des échantillons :

1g de sol est ajouté dans les tubes Falcon, avant d'ajouter 2mL de substrat. On réalise 3 répétitions par échantillon. De l'eau distillée est ajoutée à la place du substrat pour les témoins. Un blanc est préparé. L'ensemble est mis à incuber à 37°C durant 4h.

☐ Analyse par colorimétrie :

Après incubation, de l'éthanol permet d'arrêter la réaction. Les tubes sont mis à centrifuger avant de récupérer le surnageant. Du NaOH et de l'eau distillée sont ajoutés, le tout mélangé puis l'on transfère dans des cuves de spectrophotométrie. Les résultats sont exportés en fichier .csv.

## **Annexe 5** : Protocole d'extraction in-situ de l'azote minéral du sol

### Matériel et produits :

- Potassium chlorure (pour analyses réf : Merck 4936 prix 200 FF/kg) solution molaire (74,5 g/l).
- balance de laboratoire portée 1kg minimum sensibilité 0,01 g ou balance portable portée 400 ou 600 g minimum-précision 0,1 g (expl : Euromerck - Polylabo scout ohaus 801 20 236 ~1750 FF HT)
- flacons en polyéthylène à usage unique capacité 250 ml, large ouverture, double fermeture par cape à vis et obturateur (réf : OSI A 12 134 48 ou équivalent Polylabo réf 96577 vendu par cartons de 155 PU 2,80 FF)
- seringues à usage unique capacité 10 ou 20 ml UER-LOCK (réf . Polylabo 8003 PU : 0,65 FF) ou de préférence seringues de 20 ml UER-LOCK Braun Injekt (réf. Polylabo 88004 PU 1,00 FF)
- aiguilles stériles à usage unique cônes UER-LOCK 38/8 (réf Polylabo 1013 G21 PU : 0,40 FF)
- filtres à usage unique acétate de cellulose porosité 0,2 $\mu$  diam 25 mm cônes UER-LOCK non stériles réf : Polylabo 22691 par paquets de 50 PU 8,80 FF Millipore SLGPR25KS ou SLGP033RB en pqt de 1000 : 4500 FF environ les 1000)
- vénojects (vacutainer) tubes secs non siliconés : réf Polylabo 02150 01(PU 2,30 FF) ; capacité 10 ml.
- matériel d'échantillonnage sur le terrain : bassines ; sonde à prélèvements adaptée à la profondeur à prélever au type de sol ; tamis à mailles inox de 3 mm avec fond correspondant )
- boites à tare en aluminium capacité 300 ml (CDP Emballages. vendues par 76 ; PU 9F54 pièce) ou équivalent. Ou sachets plastiques résistants à 100°C.
- éprouvette graduée de 250 ml.
- mesurette "de terrain" permettant de prélever environ 10 g de terre humide.

### Mode opératoire :

- Au laboratoire avant la campagne de prélèvement : Préparer le matériel nécessaire pour une série de prélèvements (prévoir environ 10 % de matériel "en plus) et au moins un "blanc" par série de prélèvement. Soit : préparer une quantité suffisante de KCl environ molaire pour toute la série de prélèvements à effectuer peser une série de boites à tare vides (sans le couvercle) et les numéroter (H0). peser une série de flacons de 250 ml à usage unique vides mais bouchés et les numéroter (P0). Ajouter à l'éprouvette 180 ml de solution molaire de KCl, reboucher et peser à nouveau les flacons (P1).

-sur le terrain :

Prélever l'échantillon à analyser (se rapporter au protocole d'échantillonnage, tout en sachant qu'il est nécessaire de disposer d'au moins 6 à 8 carottes par échantillon). Mélanger les diverses carottes prélevées dans une bassine de capacité 3 à 5 litres, émietter la terre et écarter, dans la mesure du possible les graviers et les cailloux pour ne garder

que la "terre fine". Prélever "au hasard" 5 mesurette de terre calibrée à 10 g environ et les mettre dans un flacon de 250 ml contenant le KCl. reboucher hermétiquement le flacon et le ranger.

Eventuellement prévoir de garder une aliquote d'au moins 1 litre de terre pour la détermination du pourcentage de terre fine.

Prélever de la même façon une autre aliquote de 50 g environ de terre qui sera placée dans les boites à tare. Procéder de même pour tous les échantillons à prélever.

-au laboratoire après la série de prélèvements :

Peser les flacons contenant le KCl et la terre humide (P2).

Peser la série de boites à tare (sans le couvercle si la première pesée à été effectuée dans les mêmes conditions) (H1).

Agiter les flacons pendant 2 heures (agitateur rotatif ou à va et vient si ce matériel est disponible) ou manuellement en passant de l'un à l' autre s' il ne l' est pas.

Mettre les boites à tare ouvertes à l'étuve à 105°C pendant 24 heures au minimum.

Le séchage étant terminé, peser à nouveau les boites à tare contenant la terre sèche (les boites ont été bouchées au sortir de l'étuve, laissées à refroidir environ une heure et sont débouchées au moment de la pesée (H2)).

Le temps d'agitation des flacons étant terminé, ouvrir les flacons et laisser décanter la terre pendant au moins une heure, pendant ce temps préparer une série de "vénojects" de capacité 10 ml (identification).

Si le surnageant est clair :

Adapter une aiguille à une seringue à usage unique de 10 ml et "vider" le vacutainer allant recevoir l'échantillon.

Prélever à l'aide d' une seringue à usage unique environ 10 ml de surnageant et le jeter pour rincer la seringue, prélever à

nouveau environ 10 ml de surnageant et adapter à la seringue un filtre à usage unique "minisart" 0,2µ et une aiguille.

Injecter à travers le septum du vacutainer la solution prélevée dans le vacutainer. Par mesure de précautions, il est recommandé de doubler ce prélèvement.

Ne pas oublier de traiter de la même façon le "blanc de série".

Si le surnageant est trouble : (nota : cette éventualité est rare. Il suffit qu'il soit suffisamment clair pour pouvoir filtrer 10 ml sans colmater le filtre).

Filtrer sur filtre "moyen" sec en recueillant le filtrat dans un récipient "propre et sec" (un second flacon d'agitation ou même des verres ordinaires propres et secs conviennent très bien). Rejeter les premiers ml de filtrat, recueillir de 30 à 50ml de filtrat et ensuite poursuivre les opérations telles que décrites dans le cas des échantillons où la suspension filtrée est claire.

Préparer un fichier contenant une identification claire des échantillons, les divers poids pour détermination de l'humidité (H0 ; H1 ; H2) et des calculs de teneur en azote (P0 ; P1 ; P2). et transmettre les vénojects contenant les échantillons à analyser au laboratoire qui y dosera N-NH<sub>4</sub> et N-NO<sub>3</sub> (colorimétrie automatique).

#### Calculs

Humidité des échantillons : H% (par rapport au sol sec) =  $(H1-H2) * 100 / (H2-H0)$ .

Teneur en azote (Ni ; mg/kg de terre sèche N-NH<sub>4</sub> ou N-NO<sub>3</sub>) :

si Ti = mg/l de N) pour l'échantillon i d' humidité (Hi) et Tcelle du "blanc de série"

Teneur de l'aliquote analysée (0 correspondant :

$$Ni = (Ti - T0) * (((P1 - P0)/1.04) + ((P2 - P1) * Hi / (Hi + 100))) / ((P2 - P1) * 100 / (100 + Hi))$$